

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

BRUNA DA ROSA MAGGI SANT'HELENA

**EFEITOS DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA
REATIVIDADE VASCULAR RENAL DURANTE A SEPSE EM RATOS**

CURITIBA

2015

BRUNA DA ROSA MAGGI SANT´HELENA

**EFEITOS DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA
REATIVIDADE VASCULAR RENAL DURANTE A SEPSE EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Sant'Helena , Bruna da Rosa Maggi

Efeitos de bloqueadores de canais de potássio na reatividade vascular renal durante a sepse em ratos. / Bruna da Rosa Maggi Sant'Helena. – Curitiba, 2015.

104f.: il. ; 30cm.

Orientador: José Eduardo da Silva Santos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

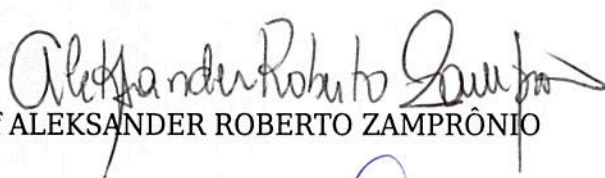
1. Rim. 2. Canais de Potássio. 3. Choque septico. I. Título II. Santos, José Eduardo da Silva. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Doutorado de **BRUNA DA ROSA MAGGI SANT HELENA**, intitulada: "**EFEITOS DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL DURANTE A SEPSE EM RATOS**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua.....*Aprovação*....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Doutor em FARMACOLOGIA**.


Curitiba, 24 de Julho de 2015.



Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRÔNIO



Prof ALEXANDRA ACCO



Prof JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS



Prof AUREA ELIZABETH LINDER



Prof CARLOS RENATO TIRAPELLI



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM FARMACOLOGIA

No dia 24 de Julho de 2015 às 13:30, na sala 107, Centro Politécnico, do Setor de da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da doutoranda **BRUNA DA ROSA MAGGI SANT HELENA** para a Defesa Pública de sua Tese intitulada: "**EFEITOS DE BLOQUEADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL DURANTE A SEPSE EM RATOS**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Professores Doutores: ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRÔNIO, ALEXANDRA ACCO, JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS, AUREA ELIZABETH LINDER, CARLOS RENATO TIRAPELLI. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a aluna, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a doutoranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela da aluna. A doutoranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora, outorgando-lhe o Grau de **Doutor em FARMACOLOGIA**. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, SECRETARIA, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 24 de Julho de 2015.


PATRÍCIA POTT

Secretaria do Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA


Prof JOSÉ EDUARDO DA SILVA SANTOS
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof ALEKSANDER ROBERTO ZAMPRÔNIO


Prof ALEXANDRA ACCO


Prof AUREA ELIZABETH LINDER


Prof CARLOS RENATO TIRAPELLI

“Não consulte seus medos, mas suas esperanças e sonhos. Não pense sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não desenvolvido. Não se preocupe com os fracassos, acredite naquilo que você ainda realizará”.

Papa João XXIII

Ao meu filho Lucas, o presente mais lindo que já recebi. Por me ensinar que, a felicidade está nos momentos simples da vida. Obrigada pelos seus sorrisos, pelo seu abraço carinhoso, e por me ensinar a ser forte, e a amar infinitamente.

Ao meu marido Leandro, meu grande amor, companheiro, e amigo. Obrigada pelo seu apoio, sua compreensão e sua carinhosa dedicação à família.

Aos meus pais, Antonio e Maria Piedade, meus exemplos de vida, pela grande luta para garantir nossos estudos e pelos sábios ensinamentos. Obrigada por serem meus pais. Minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Cíntia e Michel pela amizade incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar força, determinação e coragem para sempre seguir com fé. Obrigada por colocar pessoas especiais na minha vida que contribuíram e auxiliaram na realização desse trabalho.

À toda minha família, pelas constantes demonstrações de carinho, incentivo e amor. Amo vocês.

Ao professor Dr. José Eduardo da Silva Santo, pela orientação desse trabalho, pela confiança, pela paciência e compreensão de muitos momentos importantes na minha vida.

À professora Dr.^a Ana Durce Oliveira da Paixão pelo exemplo de humildade, pelo apoio, pelos ensinamentos, e pela oportunidade da realização de experimentos e da vivência em seu laboratório.

À Professora Dr.^a Maria Consuelo, pela oportunidade e consideração.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia pelos conhecimentos transmitidos.

À coordenação do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, em especial Prof^a Alexandra e Prof^a Juliana, pela atenção sempre imediata e apoio.

Aos meus “irmãos científicos” Prof Dr. Leucio Duarte Viera Filho e Dr.^a Priscila de Souza, pelos ensinamentos, amizade e incentivos constantes.

Aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório, Edjair, Juliane e Regina pelos momentos de alegria, pelos ensinamentos e pela amizade que levarei para sempre comigo.

Aos colegas de laboratório, Karla Lorena, Amanda, Ronald, Sandra e Rita pelos momentos compartilhados ao longo desses anos e pelos ensinamentos.

Aos funcionários, Adriane (Departamento de Farmacologia - UFSC), Silvia e Patrícia (Departamento de Farmacologia - UFPR), e Cláudia (Departamento de Fisiologia –UFPE) pela atenção e auxílio.

Aos animais meu respeito e gratidão.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte da minha vida, e que nesse período, participaram de maneira direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O SISTEMA RENAL	1
1.1.1 A insuficiência renal aguda na sepse	4
1.2 SEPSE: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	7
1.2.1 Hipotensão e disfunção vascular na sepse: características gerais e vias mais frequentemente estudadas.....	10
1.3 CANAIS DE POTÁSSIO	12
1.3.1 Canais de K ⁺ dependentes de voltagem (K _v 1-12)	14
1.3.2 Canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ (KCa1-3).....	14
1.3.3 Canais de K ⁺ retificadores de influxo (K _{ir} 1-6)	15
1.3.4 Canais de K ⁺ de dois poros (K2P).....	16
1.3.5 Canais de potássio na sepse	17
1.4 ASPECTOS GERAIS DA TERAPÊUTICA COM AGENTES VASOCONSTRITORES E INOTRÓPICOS NA SEPSE	19
 2.HIPÓTESE	 22
 3.OBJETIVOS.....	 23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 24
4.1 ANIMAIS.....	24
4.2 DROGAS E SAIS	24

4.3 PARTE I: ASPECTOS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL EM MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR CLP	25
4.3.1 Indução da sepse pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	25
4.3.2 Curva de sobrevivência	26
4.3.3 Rim perfundido <i>in vitro</i>	26
4.3.4 Atividade diurética	28
4.3.5 Dosagens bioquímicas	28
4.3.5.1 Dosagens de creatinina, eletrólitos (Na^+ e K^+) e proteinúria.....	29
4.3.5.2 Dosagem de nitrato/nitrito (NO_x) séricos	29
4.3.5.4 Hemograma.....	29
4.3.5.3 Indicadores de estresse oxidativo - TBARS e GSH.....	30
4.4 PARTE II: AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL POR FLUXÔMETRIA (FSR_f) E DOS EFEITOS DE AGENTES VASOPRESSORES E INOTRÓPICOS.....	31
4.4.1 Fluxo sanguíneo renal por fluxômetria (FSR_f)	31
4.5 PARTE III: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS MODULADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL E FSR	33
4.5.1 Rim perfundido <i>in vitro</i>	33
4.5.2 Avaliação do fluxo sanguíneo renal por laser Doppler (FSR_{LD})	34
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS.....	38
5.1 PARTE I: ASPECTOS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL EM MODELO DE SEPSE POR CLP	38
5.1.1 Curva de sobrevivência	38
5.1.2 Caracterização da reatividade vascular renal em modelo de sepse por CLP ..	39
5.1.2.1 Alterações na reatividade do leito vascular renal <i>in vitro</i> para a noradrenalina, fenilefrina e vasopressina durante a sepse induzida por CLP	39
5.1.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos e aspectos funcionais renais no modelo de sepse por CLP.....	45
5.2 PARTE II: EFEITOS SISTÊMICOS E RENAIIS DE AGENTES VASOCONSTRITORES E INOTRÓPICOS EM ANIMAIS ANESTESIADOS	49
5.3 PARTE III: EFEITO DOS MODULADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL E FSR	61
5.3.1 Efeito da inibição de canais de potássio, com TEA ou GLB, no aumento da PPR induzida por vasoconstritores em modelo de rim isolado <i>in vitro</i>	61
5.3.2 Efeito dos moduladores de canais de K^+ sobre a pressão arterial média e fluxo sanguíneo renal por laser Doppler (FSR_{LD}) em animais com sepse anestesiados ...	64

6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
Ang II	Angiotensina II
ATP	Trifosfato de adenosina
Ba ²⁺	Bário
Bpm	Batimentos por minuto
Ca ²⁺	Cálcio
CLP	Ligação e perfuração do ceco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético disódico
E _m	Potencial de membrana
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FC	Frequência cardíaca
FE	Fenilefrina
FG	Filtração glomerular
FSR	Fluxo sanguíneo renal
FSR _f	Fluxo sanguíneo renal por fluxometria
FSR _{LD}	Fluxo sanguíneo renal por laser Doppler
FU	Fluxo urinário
GLB	Glibenclamida
h	hora
IBTX	Iberiotoxina
IL-1	Interleucina 1
Inos	Óxido nítrico sintase induzida
IRA	Insuficiência renal aguda
i.p.	intraperitonal
i.v.	intravenoso
K ⁺	Potássio
K _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
K _{Ca}	Canais de potássio ativados por Ca ²⁺
K _{Ca1}	Canais de potássio ativados por Ca ²⁺

K _{Ca} 1.1	Canais de potássio ativados de alta condutância ativados por Ca ²⁺
K _{ir}	Canais de potássio retificadores de influxo
K _{ir} 6.1-6.2	Canais de potássio dependentes de ATP
K _v	Canais de potássio dependente de voltagem
LPS	Lipopolissacarídeo
L-NAME	N-ω-nitro-L-arginina metil éster
min	minutos
Mg/dl	Miligramas por decilitros
mm Hg	Milímetros de mercúrio
Na ⁺	Sódio
nmol/Kg	Nanomol por quilograma
NO	Óxido nítrico
NE	Noradrenalina
NO _x	Nitrato e nitrito
PAM	Pressão arterial média
PBS	Salina tamponada com fosfato
PPR	Pressão de perfusão renal
RVR	Resistência vascular renal
s	segundos
s.c.	subcutâneo
SNS	Sistema nervoso simpático
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
SUS	Sistema único de saúde
TEA	Tetraetilamônio
TLR	Receptores Toll-like
TNF-α	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de terapia intensiva
4-AP	Aminopiridina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustração esquemática de mecanismo envolvidos na resposta do músculo liso vascular para a ativação (à esquerda) e inibição (à direita) dos canais de K ⁺	13
Figura 2.	(A) Foto do fluxômetro utilizado no presente estudo. (B) Ilustração do posicionamento do fluxômetro na artéria renal.....	33
Figura 3.	(A) Probe de fibra ótica (Modelo VP1). (B) Probe e sistema Laser Doppler (DP2b, Moor Instruments).	35
Figura 4.	Registro típico e protocolo experimental seguido para a medida simultânea da pressão arterial média e do fluxo sanguíneo renal pelo laser Doppler em animais anestesiados.	37
Figura 5.	Curva de sobrevivência dos animais após a indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	38
Figura 6.	Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela noradrenalina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta, em A, B e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C).	41
Figura 7.	Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela fenilefrina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta em A, B e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C).....	42
Figura 8.	Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela vasopressina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta em A, e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C)	43
Figura 9.	Elevação da concentração plasmática de nitrato e nitrito (NO _x) e redução dos níveis pressóricos em animais do grupo CLP 18 h.....	46
Figura 10.	Alterações em parâmetros funcionais renais nos animais com sepse	47
Figura 11.	Alterações de parâmetros hemodinâmicos e renais em animais com sepse induzida por CLP (Grupo CLP 18 h).....	50

Figura 12. Efeitos da administração intravenosa de noradrenalina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h..	53
Figura 13. Efeitos da administração intravenosa de fenilefrina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h.....	54
Figura 14. Efeitos da administração intravenosa de dobutamina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h	55
Figura 15. Efeitos da administração intravenosa de vasopressina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h.	57
Figura 16. Efeitos da administração intravenosa de angiotensina II sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h	58
Figura 17. Influência dos bloqueadores de canais de K ⁺ TEA e GLB na hiporreatividade vascular renal para vasoconstritores em animais com sepse.....	63
Figura 18. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio (TEA, GLB e IBTX) na resposta do fluxo sanguíneo renal (doppler) e pressão arterial média para fenilefrina e noradrenalina em animais anestesiados	67
Figura 19. Efeito dos abridores de canais de potássio na resposta do fluxo sanguíneo renal (doppler) e pressão arterial média para fenilefrina e noradrenalina em animais anestesiados	68
Figura 20. Efeitos da sepse, dos bloqueadores de canais de K ⁺ e da angiotensina II na pressão arterial e fluxo sanguíneo renal por laser doppler em ratos .	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critério de RIFLE para classificação da disfunção renal aguda.....	5
Tabela 2. Terminologia da sepse e suas definições.....	8
Tabela 3. Área sob a curva dos efeitos dos vasoconstritores na pressão de perfusão renal (PPR) em modelo de rim isolado <i>in vitro</i> , de animais controle e com sepse.....	44
Tabela 4. Parâmetros hematológicos dos animais do grupo controle e CLP 18 h .	46
Tabela 5. Valores de peroxidação lipídica por mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de glutathiona reduzida (GSH), em homogenatos de rim.....	48
Tabela 6. Concentração sérica e urinária dos íons sódio e potássio nos animais dos grupos controle e CLP 18 h.....	49
Tabela 7. Efeitos dos agentes vasoconstritores e inotrópicos na frequência cardíaca em animais anestesiados	59
Tabela 8. Duração do efeito de drogas vasoconstritoras e inotrópicos na pressão arterial média (PAM) e no fluxo sanguíneo renal (FSR_f) em animais anestesiados.	60
Tabela 9. Efeitos da sepse induzida por CLP e do bloqueio dos canais de potássio na pressão de perfusão renal (PPR) basal <i>in vitro</i>	62
Tabela 10. Efeito dos bloqueadores de canais de K^+ na frequência cardíaca (FC) de animais controles e com sepse anestesiados.	70

RESUMO

Bloqueadores de canais de efluxo para potássio vêm sendo avaliados como uma ferramenta farmacológica promissora para reverter o quadro hipodinâmico na sepse. Entretanto, seus efeitos em órgãos específicos ainda são pouco conhecidos. Nosso objetivo foi estudar os efeitos de agentes vasoativos e a influência de moduladores de canais para potássio sobre a reatividade vascular renal e o fluxo sanguíneo renal (FSR) durante a sepse. Foram utilizados bloqueadores e ativadores de canais de potássio em estudos *in vitro* (rim isolado perfundido) e *in vivo*, que incluíram avaliações simultâneas da pressão arterial média e do FSR, em modelo de sepse induzida pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) em ratos. No tempo de 18 h após a CLP (grupo CLP 18 h), os animais apresentaram alterações bioquímicas e funcionais renais compatíveis com um quadro de sepse, com a presença de insuficiência renal aguda (IRA), acompanhadas de hiporreatividade para a fenilefrina e noradrenalina. Nas avaliações *in vivo*, observou-se redução da PAM e do FSR, e elevação na resistência vascular renal no grupo CLP 18 h, acompanhados por menor responsividade sistêmica (na PAM) e renal (no FSR) para a fenilefrina, dobutamina, noradrenalina e angiotensina II. A perfusão com tetraetilamônio (TEA, 1 mM; um bloqueador não seletivo de canais de K⁺), restaurou a reatividade renal para a fenilefrina no grupo CLP 18 h. Por outro lado, quando avaliada *in vitro*, a glibenclamida (GLB, 40 µM; um bloqueador seletivo de canais K_{ir}6.1 e K_{ir}6.2), reduziu a pressão de perfusão renal basal no grupo CLP 18 h, bem como os efeitos da noradrenalina em ambos os grupos (controle e CLP 18 h). Nas avaliações *in vivo*, tanto o TEA (360 µmol/Kg) quanto a GLB (40 µmol/Kg), mas não a iberitoxina (IBTX; 0,3 nmol/K/min/5 min), elevaram a PAM basal dos animais com sepse, sem modificar o FSR basal. Por outro lado, tanto a GLB quanto a IBTX, mas não o TEA, exacerbaram a redução do FSR causada pela fenilefrina (30 nmol/kg) e pela noradrenalina (10 nmol/kg), apenas nos animais com sepse. O ativador seletivo de canais K_{Ca}1.1, o NS 1619 (30 nmol/kg), não causou nenhuma modificação na PAM e no FSR dos animais de ambos os grupos. Entretanto, a administração de minoxidil (10 µmol/Kg; um ativador seletivo de canais K_{ir}6.1 e K_{ir}6.2), reduziu os efeitos da fenilefrina e da noradrenalina na PAM, tanto no grupo CLP 18 h como no controle. Além disso, o minoxidil reduziu o efeito da noradrenalina no FSR somente nos animais do grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos em animais do grupo CLP quando os efeitos da angiotensina II sobre a PAM e o FSR foram avaliados após a administração de GLB. Esses resultados revelam que, apesar dos benefícios dos bloqueadores na restauração dos níveis pressóricos, o bloqueio de diferentes subtipos de canais para potássio no sistema renal pode prejudicar a já comprometida perfusão sanguínea dos rins durante a sepse, principalmente quando associados com agentes vasoativos como a noradrenalina e fenilefrina.

Palavras-chave: rim, canais de potássio, leito vascular renal, fluxo sanguíneo, choque séptico.

ABSTRACT

Potassium channel blockers have been evaluated as a pharmacological tool in the treatment of cardiovascular failure in sepsis. However, their effect on specific organs remains to be elucidated. The aim of this study were to evaluate the effects of vasoactive drugs and the influence of potassium channel blockers and openers in *in vitro* and *in vivo* approaches, including the simultaneous analyses of mean arterial pressure (MAP) and renal blood flow (RBF), in an experimental model of sepsis induced by the cecal ligation and puncture (CLP) model in rats. When evaluated at 18 h after the CLP surgery (CLP 18 h group), impaired parameters in both biochemical measurements and renal function were found, confirming the ability of our model to induce acute renal failure, and vascular hyporeactivity to norepinephrine and phenylephrine. The CLP 18 h group displayed impaired changes in the MAP, RBF, and renal vascular resistance, after systemic administration of phenylephrine, dobutamine, norepinephrine, and angiotensin II. The continuous perfusion with tetraethylammonium (TEA, 1 mM; a non-selective K⁺ channel blocker), restored the renal reactivity to phenylephrine in the CLP 18 h group. However, when tested *in vitro*, administration of glibenclamide (GLB, 40 µM; a selective blocker of K_{ir}6.1 and K_{ir}6.2), reduced the basal renal perfusion pressure in both CLP 18 h and control groups. Both TEA (360 µmol/Kg) and GLB (40 µmol/Kg), but not iberiotoxin (IBTX, 0.3 nmol/Kg/min/5 min), increased the basal MAP in septic animals, without any effect on the basal RBF. On the other hand, both GLB and IBTX, but not TEA, enhanced the reduction in the RBF induced by phenylephrine (30 nmol/Kg) and norepinephrine (10 nmol/Kg), an effect restrict to the CLP 18 h group. The selective K_{Ca}1.1 opener NS 1619 (30 nmol/Kg) did not induce any change in the MAP and RBF of control or CLP 18 h group. However, administration of minoxidil (10 µmol/Kg; a selective K_{ir}6.1 and K_{ir}6.2 opener), reduced the effects of phenylephrine and norepinephrine on MAP, in both CLP 18 h and control groups. In addition, minoxidil reduced the effect of norepinephrine on the RBF in control, but not in the CLP 18 h group. Similar results were obtained when the effects of angiotensin II on the MAP and RBF were evaluated in the CLP 18 h group after administration of GLB. These results disclose that, in spite of the ability of K⁺ channel blockers to restore the MAP, blockade of different K⁺ channel subtypes in the renal system may deteriorate the already reduced blood perfusion in kidneys during the septic insult, mainly when these drugs are associated with pressor agents such as norepinephrine and phenylephrine.

Keywords: Kidney, potassium channels, renal vascular bed, blood perfusion, septic shock.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O SISTEMA RENAL

O fluxo sanguíneo de um determinado órgão geralmente é regulado pelas suas necessidades específicas e metabólicas, bem como pela pressão arterial suficiente para favorecer a perfusão tecidual adequada (CHADE, 2013; INCE, 2005). No sistema renal, o sangue que irriga o rim não tem somente a função de suprir as necessidades metabólicas (AIRES, *et al.*, 1999); todo o fluxo sanguíneo renal (FSR) passa por processos complexos de filtração, reabsorção e secreção no néfron que culminam na eliminação de substâncias indesejadas do organismo através da urina formada. Adicionalmente, o rim desempenha diferentes funções fundamentais como: regulação do equilíbrio de água e eletrólitos, controle da osmolaridade dos líquidos corporais, regulação da pressão arterial; manutenção do equilíbrio ácido-base, secreção, metabolismo e excreção de hormônios, e gliconeogênese (para revisão ver NAVAR, 2005; TAAL *et al.*, 2012).

A função renal, muito mais do que outros órgãos, demonstra uma dependência do sistema vascular renal. Desta forma, o sistema renal é conhecido por ser ricamente vascularizado. Macroscopicamente é constituído por dois rins, localizados na posição retroperitoneal do abdome, no qual, em uma região conhecida como *hilo* entram e saem vasos importantes, como as artérias e veias renais, e o ureter, responsável pelo carreamento da urina formada até a bexiga (AIRES *et al.*, 1999; GUYTON & HALL, 2006). A artéria renal, a partir da entrada no rim, se divide progressivamente em ramos menores até formar a porção microscópica renal, constituída pelas arteríolas aferentes, corpúsculo renal, arteríolas eferentes e capilares peritubulares que constituem a menor unidade funcional renal, o néfron (CHADE 2013). Desta forma, diferente de outros órgãos, a microcirculação renal é caracterizada por dois vasos de resistência independentes, a arteríola aferente e a arteríola eferente, as quais são importantes no processo de formação de urina pela filtração glomerular (GUAN & INSCHO, 2011; CARMINES, 2010). Além disso, a microcirculação renal possui uma rede de vasos conhecidos como capilares peritubulares, que acompanham os túbulos renais, nos quais ocorrem os processos

finais de formação da urina, conhecidos como reabsorção e secreção tubular. Assim, através de modificações na resistência das arteríolas eferentes e aferentes ocorre a regulação da pressão hidrostática nos capilares glomerulares e peritubulares, o controle da taxa de filtração glomerular, e a reabsorção tubular em resposta às demandas metabólicas do organismo.

Diferentes fatores neurais e humorais, e diferentes substâncias vasoativas, influenciam a resistência da microcirculação renal e, conseqüentemente, alteram a taxa de filtração glomerular e o FSR (NAVAR *et al.*, 1996; HANSEN, 2009). O sistema nervoso simpático (SNS) é um dos mais importantes reguladores do FSR e da filtração glomerular, pois inerva tanto as arteríolas aferentes quanto as eferentes (D'ELIA & WEINRAUCH, 2013; DIBONA, 2000). Em geral a estimulação simpática causa constrição de ambas as arteríolas e diminuição do FSR e da filtração glomerular. O sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA) também possui um papel importante na regulação da filtração glomerular e do FSR, principalmente pelo efeitos mediados pela angiotensina II na circulação renal. Um aumento na concentração plasmática de angiotensina II resulta em aumento da resistência vascular renal e, conseqüente, redução do FSR e da taxa de filtração glomerular (NAVAR, 2005; HANSEN, 2009). Além disso, o FSR também pode ser influenciado por diversas substâncias vasoativas produzidas localmente, por exemplo pelo endotélio vascular. O óxido nítrico (NO) e a endotelina, além dos derivados do ácido araquidônico e fatores humorais como a vasopressina, são algumas das substâncias vasoativas com grande influência sobre a função renal (STOCKAND, 2010; GUAN & INSCHO, 2011).

Apesar dos rins receberem aproximadamente 20% do débito cardíaco, eles apresentam uma característica fisiológica importante, que é a capacidade de manter constantes o FSR e a taxa de filtração glomerular, mesmo quando a pressão de perfusão é alterada. Desta forma, as flutuações na pressão arterial sistêmica, dentro de condições fisiológicas não repercutem modificações na hemodinâmica renal, graças a um mecanismo eficiente conhecido como autorregulação renal (LOUTZENHISER *et al.*, 2006; CUPPLER & BRAAM, 2007).

A autorregulação renal é um processo intrínseco dos rins, que ocorre quando a pressão de perfusão arterial renal é alterada, possui dois mecanismos

principais: i) o miogênico e, ii) o *feedback* tubuloglomerular (CUPPLES & BRAAM, 2007; PIHL *et al.*, 2012; BIDANI *et al.*, 2013). Em condições fisiológicas, o mecanismo miogênico é responsável por 50% do controle, enquanto o *feedback* tubuloglomerular e um terceiro mecanismo (ainda pouco conhecido), contribuem com cerca de 20 a 50% no processo de regulação do FSR (DAUTZENBERG; KEILHOFF; JUST, 2011). O mecanismo miogênico é uma resposta do músculo liso vascular renal ao aumento ou queda da tensão da parede vascular (LOUTZENHISER *et al.*, 2006; JUST, 2007; DAUTZENBERG; KEILHOFF; JUST, 2011). Já o *feedback* tubuloglomerular é um mecanismo mais complexo, e envolve a vasoconstrição da arteríola aferente em resposta às concentrações de cloreto de sódio do fluido intratubular no túbulo distal (JUST, 2007).

A presença de patologias crônicas como, por exemplo, o diabetes e a hipertensão, têm sido amplamente discutida na literatura como responsável por alterações na autorregulação renal. No diabetes, por exemplo, a inativação do *feedback* tubuloglomerular devido ao aumento da reabsorção de sódio via co-transporte de sódio-glicose, tem sido descrita como responsável pela hiperfiltração glomerular e pelo aumento do FSR e, desta forma, parece contribuir para o surgimento da lesão renal em indivíduos diabéticos (PIHL *et al.*, 2012; OH *et al.*, 2015). Já na hipertensão, o surgimento de lesões estruturais renais em decorrência das elevações crônicas na pressão arterial resulta em comprometimento do tônus miogênico (KARLSEN *et al.*, 1997). A análise morfométrica de rins de humanos hipertensos, realizada por HILL *et al.* (2006), demonstrou evidências que se correlacionam com a perda da autorregulação renal, como a presença de dilatação da arteríola aferente, hipertrofia glomerular e a presença de glomeruloesclerose.

Assim como a elevação da pressão pode ser responsável por lesões no sistema renal, o rim também pode ser o responsável pela hipertensão, como por exemplo, na hipertensão renovascular (ANDERSON *et al.*, 2000). A hipertensão renovascular pode ser definida como uma forma de hipertensão secundária, decorrente da redução do FSR, em resposta a estenose da artéria renal e ativação do SRAA (TEXTOR & LERMAN, 2010; CHELKO *et al.*, 2012).

Dentro do contexto da fisiologia clássica abordada nos parágrafos anteriores, o nível médio de pressão arterial é mantido relativamente constante por ação de mecanismos neurais, locais e hormonais, sendo que o sistema renal desempenha papel importante na regulação da pressão arterial a longo prazo, através do mecanismo de pressão/natriurese/diurese (NAVAR, 2005; TAAL *et al.*, 2012).

Além das manifestações crônicas figurarem como um mecanismo chave para o surgimento de alterações renais e/ou pressóricas, as modificações agudas na pressão arterial também podem ser responsáveis por modificações no FSR, como o observado nos quadros hemorrágicos e nos estados de choque séptico. Tanto o choque séptico quanto o choque hemorrágico se caracterizam pela presença de baixa perfusão tecidual, falência de órgãos e alta mortalidade (ALMAC *et al.*, 2012; REGUEIRA *et al.*, 2011). Como exemplo e foco deste estudo, a sepse, a sepse severa e o choque séptico são classicamente conhecidos por gerar uma hipotensão severa, geralmente associada à disfunção vascular (ver detalhes no item 1.2), que comprometem o funcionamento de vários órgãos, incluindo o sistema renal.

1.1.1 Insuficiência renal aguda na sepse

Na sepse, a hipovolemia e a hipotensão prolongada prejudicam a perfusão tecidual, contribuindo para a falência de órgãos como os rins, em um processo que frequentemente inicia-se com a insuficiência renal aguda (IRA). A IRA é uma síndrome definida por um declínio da filtração glomerular, retenção de metabólitos como ureia e creatinina, desregulação de fluidos, eletrólitos e do equilíbrio ácido-base (SHARFUDDIN, *et al.*, 2012). A incidência da IRA aumenta com a severidade da sepse (WANG, 2012), e muitas vezes independe do histórico de saúde renal do paciente, visto que aproximadamente 30 a 40% de todos os pacientes com sepse desenvolvem IRA (BENES *et al.*, 2011). O desenvolvimento da IRA é responsável por aumento das taxas de mortalidade por sepse (YASUDA *et al.*, 2006).

Atualmente não existe um consenso para a classificação da IRA na sepse. Desta forma a classificação de RIFLE (do Inglês, *risk, injury, failure, loss and end-stage renal failure*, que em tradução livre significa risco, dano, falência, perda e

falência renal de estágio final), tem sido muito usada em pacientes com sepse com o objetivo de diagnosticar e classificar o nível de lesão renal (REGUEIRA *et al.*, 2011; PLATAKI *et al.*, 2011). De acordo com os critérios de RIFLE (Tabela 1), a IRA pode ser definida por redução da filtração glomerular, expressa principalmente pela elevação dos níveis plasmáticos de creatinina e redução do débito urinário (DELLINGER *et al.*, 2013; REGUEIRA *et al.*, 2011). Neste sentido, muitos estudos clínicos evidenciam a utilização dos critérios de RIFLE na IRA decorrente da sepse, e desta forma demonstram uma relação linear entre a taxa de mortalidade e a severidade da contagem de RIFLE (REGUEIRA *et al.*, 2011; HOUSE & RONCO, 2008).

Tabela 1. Critério de RIFLE para classificação da disfunção renal aguda.

<i>Categoria</i>	<i>Critério FG</i>	<i>Critério FU</i>
Risco (<i>Risk</i>)	↑ Creatinina x1,5 ou diminuição da FG >25%	FU < 0,5 ml/Kg/h x 6 h
Lesão (<i>Injury</i>)	↑ Creatinina x 2 ou diminuição da FG >50%	FU < 0,5 ml/Kg/h x 6 h
Falência (<i>Failure</i>)	↑ Creatinina x 3 ou diminuição da FG >75%	FU < 0,3 ml/Kg/h x 6 h
Perda (<i>Loss</i>)	IRA persistente = completa perda da função renal > 4 meses	
IRC (<i>ESRD</i>)	Estágio final da Insuficiência renal crônica (IRC) > 3 meses	

FG: filtração glomerular; FU: fluxo urinário; IRA: insuficiência renal aguda; IRC: insuficiência renal crônica; ESKD: end-stage kidney disease. (FONTE: REGUEIRA, *et al.* 2011).

Além dos critérios de RIFLE, investigações clínicas e experimentais demonstram a existência de biomarcadores para um diagnóstico mais precoce da IRA na sepse, visto que a elevação da creatinina plasmática é considerada um fenômeno tardio, associada com a redução da filtração glomerular (REGUEIRA *et al.*, 2011). Dentre eles destacam-se a lipocalina associada com gelatinase de neutrófilos (NGAL, do Inglês *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), liberada em qualquer lesão tecidual (URBSCHAT *et al.*, 2011); a interleucina-18 (IL-18), que pode

ser detectada na urina em casos de lesões tubulares renais, e a molécula 1 de lesão renal (KIM-1, do Inglês *kidney injury molecule-1*), que demonstra ter a expressão elevada em casos de isquemia tubular renal (URBSCHAT *et al.*, 2011; RONCO *et al.*, 2014) .

O diagnóstico difícil e o tratamento pouco eficaz da IRA na sepse são reflexos da complexidade dos mecanismos envolvidos na sepse e na IRA, os quais ainda não são completamente conhecidos, apesar de evidências experimentais e clínicas demonstrarem a participação dos fatores hemodinâmicos e inflamatórios. Uma das alterações hemodinâmicas frequentes na sepse é a redução do FSR. O FSR representa uma medida de alta importância para a função renal. Em termos de fluxo (em relação ao tamanho do órgão) o rim de humanos é quatro vezes mais irrigado do que o fígado ou o músculo esquelético em exercício, e oito vezes mais do que o coração. O estudo do FSR em humanos com sepse é complexo, principalmente ao considerarmos a dificuldade de sua mensuração. Por sua vez, em animais de experimentação, os dados referentes ao FSR são controversos. Uma revisão sistemática realizada por Langenberg *et al* (2005) aponta que o FSR mostrou-se reduzido em 62% dos estudos envolvendo sepse experimental.

A redução do FSR na sepse reflete a relação direta entre o FSR e a pressão arterial. O FSR apresenta vários mecanismos de regulação, que permitem adaptá-lo às necessidades do organismo em diferentes situações. Embora a autorregulação renal pareça estar preservada em modelos experimentais de sepse (BURBAN *et al.*, 2013), estudos demonstram que o óxido nítrico (NO) produzido pela eNOS atenua a resposta miogênica do FSR (DAUTZENBERG *et al.*, 2011).

Somente as alterações hemodinâmicas não parecem ser suficientes para explicar a IRA na sepse. Uma variedade de substâncias vasoativas, neurais e hormonais influencia o FSR. A produção excessiva de NO sistêmico tem sido apontada como fator crucial no desenvolvimento da hipotensão e da disfunção vascular na sepse (SU *et al.*, 2010; CAUWELS, 2007; COHEN *et al.*, 2001). Em condições fisiológicas, o NO causa efeitos protetores associados à manutenção do FSR (DAUTZENBERG *et al.*, 2011). No entanto, o aumento da isoforma induzida da NOS (iNOS) nos rins de animais endotoxêmicos (HEEMSKERK *et al.*, 2006), foi

correlacionado com lesões no tecido renal devido ao aumento da produção de peroxinitrito (WANG *et al.*, 2012; SEIJA *et al.*, 2012).

Além do NO, diversas citocinas podem estar entre os fatores responsáveis pela IRA na sepse. Evidências experimentais demonstram uma associação entre a redução de NF-k B e TNF- α e a diminuição da injúria renal em animais com sepse (SCHMIDT *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2012). Além disso, mediadores inflamatórios parecem ser responsáveis pela ativação excessiva do SNS, via sistema nervoso central (MAY *et al.*, 2012). O SNS é um dos mais importantes reguladores do FSR e, em condições normais, qualquer perda mínima de volume causa o aumento da atividade dos SNS (WEAVER 1977; KOPP *et al.*, 2008).

Apesar da fisiologia renal ser relativamente bem conhecida, as alterações que ocorrem na função renal durante a sepse ainda são pouco conhecidas. Nesse sentido a compreensão dos complexos mecanismos ligados à sepse e de sua influência na disfunção renal, nos permite compreender melhor os objetivos da terapêutica atual, e ainda investigar novas alternativas no tratamento da sepse, sem descartar os efeitos em órgãos importantes como os rins.

1.2 SEPSE: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS

Segundo Martin (2012), a sepse é uma condição que tem sido descrita há mais de 2000 anos. No entanto, somente em 1992, o ACCP (American College of Chest Physicians) em conjunto com a SCCM (Society of Critical Care Medicine) propuseram a padronização da terminologia da sepse, com o objetivo de reduzir as divergências nas áreas médicas (BONE *et al.*, 1992; MARTIN, 2013; RIEDEMANN; GUO; WARD, 2003). Diante disso, padronizaram definições para termos comumente usados, como infecção, bacteremia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse severa, choque séptico, hipotensão induzida por sepse, e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS), conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Terminologia da sepse e suas definições.

DEFINIÇÕES
<u>Infecção</u> = Fenômeno microbiano caracterizado por uma resposta inflamatória na presença de micro-organismos ou invasão de tecido normalmente estéril por esses organismos.
<u>Bacteremia</u> = Presença de bactéria viável no sangue.
<u>Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)</u> = Resposta inflamatória sistêmica para uma variedade de insultos clínicos severos. A resposta é manifestada por duas ou mais das seguintes condições: (1) temperatura > 38°C ou < 36°C; (2) frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto; (3) frequência respiratória > 20 respirações por minuto ou PaCO ₂ < 32 mm Hg; e (4) contagem de células sanguíneas brancas > 12000/ mm ³ , < 4000/ mm ³ , ou 10% na forma imatura.
<u>Sepse</u> = É a resposta sistêmica para a infecção manifestada por duas ou mais das seguintes condições como resultado da infecção: (1) temperatura > 38° ou < 36 °; (2) frequência cardíaca > 90 batimento por minuto; (3) frequência respiratória > 20 respirações por minuto ou PaCO ₂ < 32 mm Hg; e (4) contagem de células sanguíneas branca > 12000/ mm ³ , < 4000/ mm ³ , ou 10% da forma imatura.
<u>Sepse severa</u> = Sepse associada com a disfunção de um órgão, hipoperfusão, ou hipotensão. Hipoperfusão ou anormalidade na perfusão podem incluir a acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental (porém não estão limitados a esses eventos).
<u>Choque séptico</u> = Hipotensão induzida por sepse apesar de adequada reposição fluída juntamente com a presença de anormalidade na perfusão. Pode incluir a acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental (mas não está limitado a esses eventos). Dentro desse diagnóstico incluem-se pacientes que receberam agentes vasopressores ou inotrópicos mas permanecem com hipotensão e anormalidade na perfusão.
<u>Hipotensão induzida por sepse</u> = Pressão arterial sistólica < 90 mm Hg ou uma redução de ≥ 40 mm Hg do basal, na ausência de outras causas de hipotensão.
<u>Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS)</u> = presença de função anormal de órgãos em pacientes críticos, no qual a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção médica.

FONTE: Adaptado de Bone *et al.* 1992

Desde então, um número crescente de definições e conceitos contribuem para um melhor entendimento da sepse. Atualmente, segundo as Diretrizes Internacionais para Tratamento da Sepse Grave e Choque Séptico de 2012 (DELLINGER *et al.*, 2013), define-se como sepse a presença de uma infecção junto com manifestações sistêmicas da infecção. Já a sepse severa é definida como a

sepse associada com a disfunção ou hipoperfusão de um órgão ou hipoperfusão (decorrente da própria sepse), sendo que o choque séptico é definido como sepse severa associada à hipotensão refratária à reposição de fluidos e a drogas vasoativas e/ou cardioativos.

Mesmo sendo conhecida há muitos anos, a sepse e o choque séptico ainda estão entre os maiores problemas de saúde da humanidade (DELLINGER *et al.*, 2013; MARTIN *et al.*, 2003; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; SILVA *et al.*, 2004), sendo responsáveis por aproximadamente 10% de todas as mortes em todo o mundo. Além disso, são umas das principais causas de internações em unidade de terapia intensiva (UTI), gerando assim, grandes custos para a saúde pública (DELLINGER *et al.*, 2013; TELES *et al.*, 2008). Nas UTIs do Brasil, a sepse representa o principal problema de saúde pública e, segundo alguns estudos, apresenta incidência de 57 casos para 1000 pacientes a cada dia (SILVA *et al.*, 2004; TELES *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, os avanços terapêuticos e investimentos em estudos experimentais e clínicos contribuíram para a redução da taxa de mortalidade na sepse (IWASHYNA & ANGUS, 2014). No entanto, é sabido que o número de mortes em pacientes com sepse ainda permanece muito alto, visto que diferentes estudos epidemiológicos demonstraram que a taxa de mortalidade varia de 28,6% a 50% (DEREK *et al.*, 2001; TELES *et al.*, 2008). No Brasil, segundo alguns dos poucos dados disponíveis, as taxas de mortalidade referentes à sepse severa e choque séptico são de 47,3% e 52,2%, respectivamente (SILVA *et al.*, 2004).

As altas taxas de mortalidade na sepse estão relacionadas com o número de complicações e a restrita eficácia da terapêutica (GU *et al.*, 2014; BLANCO *et al.*, 2008). A falência de órgãos contribui cumulativamente para a mortalidade por sepse. Em um estudo realizado nos Estados Unidos com mais de 10 milhões de casos de sepse em um período de 22 anos, evidenciou-se que 70% dos pacientes que possuíam falência em 3 ou mais órgãos morreram. Dentro deste contexto, os autores deste e de outros estudos semelhantes têm postulado que órgãos vitais como os rins, coração e pulmões são os mais comumente afetados pela sepse (MARTIN *et al.*, 2003). Além disso, a associação de outros fatores, como comorbidades, idade avançada, alcoolismo, estado nutricional (desnutrição ou obesidade), gênero, dentre outros, podem influenciar e aumentar a mortalidade

gerada pelo choque séptico. (BLANCO *et al.*, 2008; ESPER; MARTIN, 2009; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; SILVA *et al.*, 2004)

Um estudo multicêntrico realizado em UTIs brasileiras revelou que 65,5% dos pacientes com sepse tinham como principal causa as infecções do sistema respiratório (SILVA *et al.*, 2004). Dentre outras causas de sepse incluem-se infecções do trato urinário, cirurgias e quadros de infecções agudas abdominais, e comorbidades relacionadas com o câncer (BLANCO *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2014). Dos agentes etiológicos destacam-se as bactérias gram-negativas, seguidas por bactérias gram-positivas e fungos (SILVA *et al.*, 2004; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014).

Várias medidas com finalidade de reduzir os níveis de mortalidade têm sido propostas. Por exemplo, um projeto implantado no Brasil, chamado “Controlando a infecção, combatendo a sepse”, com vigência de 2012 a 2014, e com apoio do Sistema Único de Saúde (SUS), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Ministério da Educação (MEC), teve o objetivo de capacitar os profissionais da área da saúde para promover uma redução nas taxas de mortalidade (www.ilas.org.br). Apesar de iniciativas como essa, semelhante a de outros países, persiste uma dificuldade muito grande para se identificar os sinais iniciais da sepse, dificultando e retardando o início da terapêutica adequada. As diversas descobertas em relação à sepse tem confirmado que sua fisiopatologia caracteriza-se por ser complexa, dinâmica e de difícil compreensão.

1.2.1 Hipotensão e disfunção vascular na sepse: características gerais e vias mais frequentemente estudadas.

A sepse resulta de uma interação complexa entre o microrganismo infectante e o hospedeiro e envolve respostas imune, pró-inflamatória e pró-coagulante. Por isso é consenso que a sepse caracteriza-se pela produção maciça de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias (KING *et al.*, 2014). De forma bastante sucinta, a resposta inflamatória na sepse inicia-se com a ativação da imunidade inata mediada por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs

do Inglês *pathogen-associated molecular pattern*) (MURUGAN *et al.*, 2010). Um exemplo muito importante de PAMPs são os lipossacarídeos (LPS) encontrados na parede celular das bactérias gram-negativas. Esses padrões são reconhecidos por receptores denominados “receptores *Toll-like*” (TLRs), e o receptor CD14. Uma vez ativados, os TLRs desencadeiam uma cascata de eventos que culmina com a translocação nuclear do NF- κ B, um fator de transcrição que promove a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias como, por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β). Em pacientes com sepse tem-se observado uma relação proporcional entre o aumento dos níveis de NF- κ B e o aumento da taxa de mortalidade (LIU & MALIK, 2006). Tanto o TNF- α como a IL-1, estimulam a liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos (LIU & MALIK, 2006; KING *et al.*, 2014). Dentre os inúmeros efeitos que não serão abordados aqui, as citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais (para revisão ver BOSMANN & WARD, 2014).

A produção fisiológica de NO é importante para a pressão arterial e a regulação da distribuição do fluxo sanguíneo. Na sepse ocorre uma produção excessiva de NO, que tem um papel relevante na hipotensão, cardiodepressão e hiporreatividade vascular (CAUWELS, 2007; PARRATT, 1998; FORTIN *et al.*, 2010). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L- arginina pela ação da NOS. Existem três isoformas da NOS: eNOS, nNOS e iNOS. Duas dessas isoformas, a eNOS e nNOS, são expressas constitutivamente; por outro lado, a iNOS tem sua expressão induzida por citocinas e mediadores inflamatórios em muitas células (FORTIN *et al.*, 2010). É interessante mencionar que a iNOS é expressa fisiologicamente, em pequenas quantidades, no tecido renal.

Neste contexto, muitas evidências experimentais e clínicas demonstram o aumento da expressão da iNOS na sepse (SU *et al.*, 2010; HEEMSKERK *et al.*, 2006; CAUWELS, 2007). Em estudos experimentais, o uso de inibidores para a iNOS mostrou-se capaz de reverter a hipotensão e hiporreatividade vascular características da sepse (SU *et al.*, 2010). Por outro lado, um estudo multicêntrico com 794 pacientes revelou que o uso de um inibidor não seletivo da NOS, o 546C88, aumentou a mortalidade nos pacientes com choque séptico (LÓPEZ *et al.*,

2004). Desta forma, a reversão da hipotensão e a hiporreatividade representam um grande problema do tratamento do choque séptico.

Outro mecanismo classicamente discutido na literatura como uma das causas da disfunção vascular na sepse é a ativação excessiva do SNS, com consequente dessensibilização dos receptores adrenérgicos (SCHMIDT *et al.*, 2009; DENG *et al.*, 2004). Evidências experimentais e clínicas (GROVES *et al.*, 1973; PLEINER, 2002) demonstram a liberação excessiva de catecolaminas como responsável por alterações metabólicas, imunomodulatórias e cardiovasculares na sepse. Além disso, o excesso de catecolaminas exógenas ou endógenas está relacionado com disfunção cardíaca (PORTER *et al.*, 1990), aumento de estresse oxidativo (MENDES *et al.*, 2014; PAL *et al.*, 2013), ativação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (RUBATTU *et al.*, 2013), dessensibilização dos receptores adrenérgicos (SCHMIDT *et al.*, 2009), bem como aumento da liberação de citocinas (MAY *et al.*, 2012).

Atualmente, frente aos múltiplos fatores envolvidos na fisiopatologia dessa doença, os mecanismos envolvidos na sepse têm sido discutidos e investigados. Apesar dessa ampla discussão sobre a sepse, o arsenal terapêutico ainda é limitado aos efeitos sistêmicos de agentes vasoativos, e associado a efeitos colaterais importantes, muitas vezes em diferentes leitos vasculares. Nesse sentido a busca por novos mecanismos que configurem possíveis alvos terapêuticos precisa ser estimulada.

1.3 CANAIS DE POTÁSSIO

Os canais para efluxo de potássio (K^+) são bem conhecidos pelo papel na regulação da excitabilidade da membrana (N'GOUEMO, 2014; NELSON *et al.*, 1995). Canais para efluxo de K^+ são proteínas transmembrana que permitem, seletivamente, o movimento do íon K^+ . A atividade dos canais para K^+ constitui um regulador importante do potencial de membrana de diversas células, incluindo as células do músculo liso vascular (BUCKLEY *et al.*, 2006; SOBEY, 2001).

No músculo liso vascular, quando ocorre a abertura dos canais para K^+ , o efluxo de íon K^+ aumenta, causando hiperpolarização do E_m (potencial de membrana) e, conseqüentemente, fechamento dos canais de cálcio (Ca^{2+}) ativados por voltagem; e diminuição da entrada de Ca^{2+} , resultando em vasodilatação (Figura 1). Por outro lado, o fechamento dos canais para K^+ causa despolarização do E_m , abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, aumento da concentração de Ca^{2+} no citoplasma e, conseqüentemente, a vasoconstrição (Figura 1)(NELSON *et al.*, 1995; SOBEY, 2001).

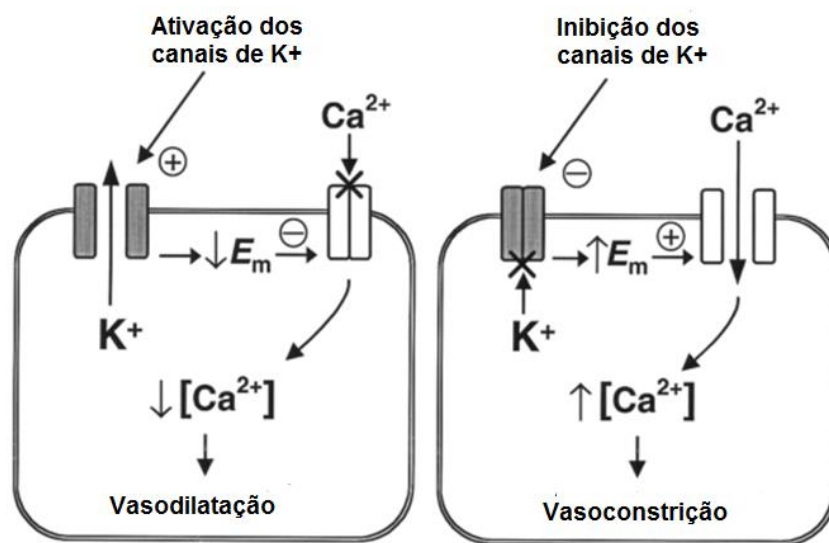


Figura 1. Ilustração esquemática de mecanismo envolvidos na resposta do músculo liso vascular para a ativação (à esquerda) e inibição (à direita) dos canais para efluxo de K^+ . Esquerda: a ativação dos canais de K^+ causa o efluxo de íons K^+ da célula, causando uma diminuição do potencial de membrana (E_m) e, conseqüentemente, o fechamento dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, seguido de redução da concentração de Ca^{2+} intracelular resultando em vasodilatação. Direita: a inibição dos canais de K^+ causa diminuição do efluxo de íons K^+ da célula, causando um aumento potencial de membrana (E_m) e, conseqüentemente, à abertura dos canais de Ca^{2+} ativados por voltagem, seguido do aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, resultando em vasoconstrição (FONTE: Adaptado de SOBEY, 2001).

Atualmente, os canais para K^+ são classificados em quatro superfamílias: i) canais de K^+ dependente de voltagem (K_v ou K_v1-12); ii) canais de K^+ ativados por Ca^{2+} (K_{Ca} ou K_{Ca1-3}); iii) canais de K^+ retificadores de influxo (K_{ir} ou $K_{ir} 1-6$); iv) e os canais de K^+ de dois poros ($K2P$ ou $K2P1-13$). Cabe ressaltar que os canais de K^+ sensíveis à adenosina trifosfato (K_{ATP}) pertencem à superfamília dos K_{ir} (SOBEY,

2001; SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012; IUPHAR/BPS-
www.guidetopharmacology.org).

1.3.1 Canais de K⁺ dependente de voltagem (K_v1-12)

Os K_v1-12 são ativados em resposta à despolarização da membrana, e têm sido identificados em células musculares lisas dos leitos vasculares coronariano, cerebral, renal, mesentérico e pulmonar (NELSON *et al.*, 1995; ALBARWANI *et al.*, 2003). As principais isoformas encontradas nas células do músculo liso vascular são K_v 1.1-1.6 e K_{v2} e K_{v7}, e adicionalmente o Kv1, no leito vascular renal. Fisiologicamente, o canal K_v contribui para a regulação do potencial de membrana e tônus das células do músculo liso vascular. Farmacologicamente, o principal inibidor desses canais é a 4-aminopiridina (4-AP) (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012), o qual tem sido útil como uma ferramenta experimental para o estudo desses canais, inclusive no músculo liso vascular.

1.3.2 Canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ (K_{Ca}1-3)

Os K_{Ca} desempenham funções importantes no controle do tônus vascular. Estruturalmente, são formados por uma unidade formadora do poro, e uma subunidade moduladora da sensibilidade ao Ca²⁺ (SOBEY, 2001). Esses canais são sensíveis à voltagem, que é modulada pela concentração de Ca²⁺ intracelular. Os K_{Ca} foram subdivididos em canais de K⁺ ativados por Ca²⁺ de grande (BKCa, do Inglês *big conductance*), intermediário (IKCa do Inglês *intermediate conductance*) e pequena condutância (SKCa do Inglês, *small conductance*) (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012; NELSON *et al.*, 1995). Dentre eles o mais conhecido e funcionalmente mais descrito é o BKCa. Atualmente, esses canais são classificados como K_{Ca}1.1 (para os canais BKCa), K_{Ca}2.1- K_{Ca}2.4 (para os canais IKCa), e K_{Ca}3 (para os canais SKCa) (IUPHAR/BPS-
www.guidetopharmacology.org).

Os $K_{Ca1.1}$ são particularmente abundantes nas células do músculo liso vascular. Eles são formados por uma subunidade α (slo), e uma subunidade β modulatória que serve para a manutenção da voltagem e sensibilidade para o Ca^{2+} (para revisão ver CLAPP; ORIE, 2007). Os $K_{Ca1.1}$ podem ser ativados por vasodilatadores que aumentam os níveis intracelulares de AMPc e GMPc (SOBEY, 2001). Farmacologicamente os $K_{Ca1.1}$ podem ser inibidos por tetraetilamônio (TEA), caribdotoxina e iberiotoxina (IBTX), e ativados por NS1619 (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012).

Já as isoformas $K_{Ca2.1}$ - $K_{Ca2.4}$, e K_{Ca3} , são canais com 5 domínios transmembranas, e podem ser bloqueados por apamina (em concentrações nanomolares), e estimulados por NS309. Os canais $K_{Ca2.1}$ - $K_{Ca2.4}$ podem ser bloqueados por caribdotoxina e TRAM-34 (MAGNUSSON *et al.*, 2007; SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012).

1.3.3 Canais de K^+ retificadores de influxo (K_{ir} 1-6)

Os canais de K_{ir} são tetrâmeros onde cada unidade α possui dois domínios transmembranares. São conhecidas 6 famílias de K_{ir} (K_{ir} 1-6), onde o K_{ir2} é um clássico canal retificador de influxo, e o K_{ir6} é um canal sensível ao ATP (K_{ATP}). São encontrados principalmente em células de músculo liso de pequenos vasos, como por exemplo, as arteríolas aferentes e eferentes no rim (CHILTON *et al.*, 2008). O Bário (Ba^{2+}) é conhecido por ser um inibidor não seletivo dos canais de K^+ . No entanto, evidências demonstram que em concentrações $< 100 \mu M$, o Ba^{2+} pode ser seletivo como inibidor dos K_{ir} (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012).

Os K_{ATP} são formados por oito subunidades proteicas, sendo 4 α -subunidades da família K_{ir} (K_{ir} 6.1 e 6.2) no qual constituem a subunidade formadora do poro, e 4 subunidades regulatórias localizadas ao redor do poro, que pertencem aos receptores sulfoniluréias (SUR1, SUR2A e SUR3A) (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012; BUCKLEY; SINGER; CLAPP, 2006b).

Tradicionalmente os $K_{ir}6.1-6.2$ são conhecidos pelos seus efeitos no processo de controle da liberação de insulina. Em especial, o $K_{ir}6.2$ está presente nas células β pancreáticas, e o seu bloqueio farmacológico tem sido muito utilizado como auxiliar na terapêutica da diabetes tipo II, visto que, sua inibição estimula a liberação de insulina (BUCKLEY; SINGER; CLAPP, 2006). Entretanto, os $K_{ir}6.1$ estão expressos no miocárdio e no músculo liso vascular. A ativação excessiva desses canais tem sido associada com redução da contratilidade vascular e redução dos níveis de pressão arterial (LI *et al.*, 2013). Farmacologicamente, são inibidos por sulfonilurêias como por exemplo a glibenclamida, e estimulados por agentes como o diazóxido, minoxidil e pinacidil (SORENSEN; BRAUNSTEIN; SALOMONSSON, 2012). Os $K_{ir}6.1-6.2$ são sensíveis ao ATP. Desta forma, a redução da disponibilidade de ATP intracelular resultante de condições isquêmicas ou em situações de hipóxia, estimula a ativação destes canais. Assim a ativação dos $K_{ir}6.1$ está associada com várias patologias, como diabetes, hipertensão crônica e aterosclerose (para revisão ver SOBEY, 2001).

1.3.4 Canais de K^+ de dois poros (K2P)

Os K2P são importantes reguladores da excitabilidade celular. Podem ser divididos em 6 subfamílias com base em suas estruturas e funções distintas: TWIK, TREK, TASK, TALK, THIK, e TRESK (PIECHOTTA *et al.*, 2011). Contribuem para a estabilização do potencial de membrana de diferentes tipos celulares, como neurônios, células do músculo cardíaco e esquelético, glia e células epiteliais (PIECHOTTA *et al.*, 2011; ENYEDI & CZIRJAK, 2010). Evidências demonstram que os K2P estão presentes no músculo vascular mesentérico e pulmonar de ratos (GARDENER *et al.*, 2004). Fisiologicamente, podem ser regulados por fatores independentes de voltagem, como por exemplo o pH, e a temperatura (ENYEDI & CZIRJAK, 2010).

1.3.5 Canais de potássio na sepse

Diversos estudos demonstram o envolvimento de canais efluxo para K^+ em várias doenças, inclusive na sepse. Foi a partir da década de 90 que evidências experimentais demonstraram que a administração de inibidores de canais de K^+ revertiam a hipotensão encontrada em animais endotoxêmicos (LANDRY & OLIVER, 1992). Desde então, estudos têm avaliado a participação dos canais de K^+ na sepse em diferentes espécies, como ratos (GARDINER *et al.*, 1999; SORDI *et al.*, 2011), cães (LANDRY & OLIVER, 1992), ovelhas (LANGE *et al.*, 2007), porcos (VANELLI *et al.*, 1995), e também em humanos (WARRILLON *et al.*, 2006; MORELLI *et al.*, 2007).

Os ensaios experimentais indicam que a ativação dos canais de efluxo para K^+ têm sido proposta como um dos mecanismos cruciais para a disfunção vascular, a hipotensão e para a hiporreatividade aos vasoconstritores que ocorrem na sepse e no choque séptico (PICKKERS *et al.*, 2006; SORDI *et al.*, 2010). Além disso, diversos estudos indicam que a ativação anormal dos canais de efluxo para K^+ nos vasos durante a sepse é consequência da ativação aumentada da via NO/guanilato ciclase (O'BRIEN *et al.*, 2009).

Diferentes subtipos de canais para K^+ estão envolvidos nos efeitos vasculares na sepse. Em ensaios *in vivo*, a glibenclamida, um inibidor seletivo dos canais $K_{ir}6.1-6.2$, restaura os níveis de pressão arterial em animais com sepse, sem demonstrar efeitos nos animais controles (SORRENTINO *et al.*, 1999; SORDI *et al.*, 2010). Esses mesmos efeitos são compartilhados, em outros estudos experimentais, quando foi utilizado um inibidor seletivo da subunidade formadora de poro, o PNU 37883A (O'BRIEN *et al.*, 2009; COLLIN *et al.*, 2011). O bloqueio dos canais $K_{ir}6.1-6.2$ tem sido alvo em diferentes estudos com sepse. No entanto, em estudo realizado por Morelli *et al.*, (2007) o uso da glibenclamida em pacientes com choque séptico falhou em restaurar os níveis de pressão arterial ou ainda em reduzir a necessidade de noradrenalina. De um modo geral, aceita-se que os canais $K_{ir}6.1-6.2$ desempenham uma função importante na sepse. Porém, numa linha um pouco diferente da levantada anteriormente, que aponta para efeitos protetores do bloqueio desses canais na sepse, um estudo bastante interessante, demonstrou que animais

knockout para os canais K_{ir} 6.1 são mais susceptíveis para a mortalidade induzida por modelo experimental de sepse (KANE *et al.*, 2006).

Sordi *et al.*, (2010), demonstraram que tanto a glibenclamida quanto o TEA foram capazes de reverter a hiporreatividade sistêmica para fenilefrina em ratos 24 h após a indução da sepse por CLP. Pickkers *et al.*, (2006) concluíram que a administração do TEA restaurou a hiporreatividade para noradrenalina, ao avaliar o fluxo sanguíneo do antebraço de humanos, após 4 horas da administração de LPS. Neste sentido a participação de outros canais, como por exemplo os K_{Ca} 1, podem estar envolvidos na disfunção vascular na sepse. No entanto, a administração da iberiotoxina, um inibidor seletivo para K_{Ca} 1.1, não se mostrou capaz de reverter os estado hipodinâmico de animais com sepse (SORDI *et al.*, 2010). Adicionalmente, um estudo realizado por O'BRIEN *et al.*, (2011) demonstraram que ratos *knockout* para canais K_{Ca} 1.1 submetidos à sepse pelo modelo de CLP não demonstraram redução da hipotensão, em comparação com os animais do grupo controle também submetidos à sepse.

Ao contrário dos efeitos sistêmicos do bloqueio dos canais de potássio na sepse, os efeitos em outros leitos vasculares ainda são pouco investigados. Por exemplo, O'BRIEN *et al.* (2009) demonstraram que, ao contrário dos efeitos observados sistemicamente, a administração do PNU37883A (também *in vivo*) não reverteu a queda do fluxo sanguíneo aórtico, hepático e renal observada em ratos endotoxêmicos. Como já mencionado anteriormente, o leito vascular renal é um dos mais acometidos na sepse, e destaca-se pela vasoconstrição contrária à clássica vasodilatação sistêmica observada na sepse.

Nos rins, além da participação dos canais para K^+ na regulação de concentrações séricas de potássio, a mudança de atividade de um ou mais canais para K^+ causa modificações na regulação da hemodinâmica renal e, conseqüentemente afeta o FSR e a filtração glomerular (para revisão ver SORENSEN *et al.*, 2012). No FSR, o uso de um coquetel de inibidores de canais para K^+ (TEA, apamina, bário, GLB e 4-AP) foi responsável pela redução de aproximadamente 90% do FSR em animais saudáveis (SOSENSEN *et al.*, 2011). Curiosamente, quando os inibidores foram administrados isoladamente não foram observados efeitos no FSR. No entanto, a expressão e função dos canais para K^+

renais podem ser modificadas em função de estados patológicos. Em animais com diabetes tipo I, por exemplo, foi observado um aumento da resposta vasodilatadora mediada pelo $K_{ir}6.1-6.2$ no tônus da arteríola aferente. Além disso, canais para K^+ contribuem com a vasodilatação nas arteríolas aferentes em animais diabéticos (BRINDEIRO *et al.*, 2008). É interessante destacar que na sepse a função dos canais para K^+ no leito vascular renal permanece por ser investigada.

Desta forma, apesar de inúmeros estudos que apontam para um papel importante dos canais para K^+ na disfunção vascular na sepse, a relevância dos mesmos no leito vascular renal durante a sepse ainda precisa ser avaliada experimentalmente. Nesse sentido, frente aos efeitos promissores do bloqueio dos canais de K^+ na sepse, o conhecimento das consequências desse bloqueio tanto no leito renal como em outros leitos vasculares precisa ser melhor investigado.

1.4 ASPECTOS GERAIS DA TERAPÊUTICA COM AGENTES VASOCONSTRITORES E INOTRÓPICOS NA SEPSE

Tradicionalmente os tratamentos para a sepse severa e o choque séptico incluem antibióticos, reposição de fluidos e vasoconstritores. Os vasoconstritores mais comumente usados são a noradrenalina, a adrenalina, a vasopressina e, em casos especiais a fenilefrina (DELLINGER *et al.*, 2013).

A noradrenalina, um potente vasoconstrictor com ação direta em receptores beta e alfa adrenérgico é o agente de primeira escolha no tratamento do choque séptico (DELLINGER *et al.*, 2013; FARAND, *et al.*, 2006). A noradrenalina é usada quando a pressão arterial média (PAM) atinge valores abaixo de 65 mm Hg, e como tratamento padrão para pacientes com hipotensão resistente à reposição de fluidos (DELLINGER *et al.*, 2013). Por outro lado, altas doses de noradrenalina estão relacionadas com o aumento da demanda de oxigênio pelos tecidos, diminuição do fluxo sanguíneo renal e mesentérico, e aumento da resistência vascular pulmonar (LEVY *et al.*, 2004). Os efeitos da noradrenalina em outros leitos vasculares na sepse é foco de muitas controvérsias e discussão. Uma revisão publicada há vários anos por Bellomo & Giantomasso (2001), fez o seguinte questionamento:

"noradrenalina no rim é amiga ou inimiga?". Os efeitos da noradrenalina no sistema renal são pouco estudados e permanece alvo de muitas controvérsias e questionamentos (ALBANÈSE *et al.*, 2004; MARIK, 2004).

Em casos de falha da noradrenalina em restaurar a pressão arterial de pacientes com sepse, outros agentes são utilizados, como por exemplo, a dobutamina. A dobutamina é recomendada para o tratamento da falência circulatória relacionada à sepse, e pode ser usada em pacientes com prejuízo da função sistólica (DELLINGER *et al.*, 2013). Porém, por ser um agente inotrópico, deve ser usado somente em pacientes altamente selecionados por causa do risco de acentuar a taquicardia (MILLER & COLEMAN, 2008). Por outro lado, estudos demonstram que a dobutamina não melhora o fluxo sanguíneo em diferentes órgãos. Por exemplo, um estudo realizado por Hernandez *et al* (2013), com paciente com sepse, demonstrou que a infusão de dobutamina falhou na melhora do fluxo na microcirculação sublingual e hepatoesplâncica, assim como em parâmetros metabólicos. Em animais com sepse a administração de dobutamina demonstra efeitos positivos na restauração hemodinâmica (LOBO *et al.*, 2009), assim como no fluxo sanguíneo mesentérico (LOBO *et al.*, 2009), e demonstra efeito hepatoprotetor (FINK *et al.*, 2013).

Em relação ao uso da adrenalina, as Diretrizes Internacionais para Tratamento da Sepse Grave e Choque Séptico de 2012 (DELLINGER *et al.*, 2013) sugerem seu uso em associação ou substituição da noradrenalina, quando for necessário um agente adicional para manter a pressão arterial em níveis adequados. Entretanto, a fenilefrina, um agonista α -adrenérgico, é usada apenas em casos restritos por pacientes com sepse, principalmente devido aos seus efeitos em outros órgãos (MORELLI *et al.*, 2008). Desta forma, é usada como terapia de resgate quando medicamentos inotrópicos/vasopressores combinados com baixas doses de vasopressina não atingem valores ideais de PAM (DELLINGER *et al.*, 2013). Em pacientes com sepse a administração de fenilefrina pode diminuir a perfusão esplâncica e prejudicar a função renal devido à diminuição do clearance de creatinina (MORELLI *et al.*, 2008).

A vasopressina é considerada um agente de segunda escolha na sepse (DELLINGER *et al.*, 2013; ASFAR *et al.*, 2006). Desta forma, é comumente usada em pacientes que não respondem a altas doses de noradrenalina. A vasopressina

pode ser utilizada em baixas doses em associação com a noradrenalina com o objetivo de elevar a PAM, ou ainda reduzir a dosagem de noradrenalina (DELLINGER et al., 2013). Em estudo com porcos com sepse associou a administração de vasopressina foi associada com redução da hiperlactatemia, bem como de lesões renais e hepáticas nesses animais (SIMON *et al.*, 2009). Por outro lado também existem estudos mostrando a incapacidade da vasopressina em modificar o FSR em animais com sepse (LEVY *et al.*, 2004).

Clinicamente os tratamentos atuais para sepse, além de objetivarem a redução da infecção sistêmica, destinam-se à reversão do estado hipodinâmico, sendo que muitas vezes os efeitos em outros órgãos são desconsiderados ou ainda desconhecidos. Desta forma, a terapêutica utilizada pode comprometer o funcionamento de alguns órgãos e favorecer ou agravar a subsequente disfunção do mesmo. Como discutido anteriormente a disfunção de múltiplos órgãos está associada com taxas elevadas de mortalidade na sepse.

Frente a estes resultados e considerando que existem poucos estudos relacionados aos efeitos de agentes vasoativos e inotrópicos utilizados no tratamento da sepse especificamente no leito vascular renal, nós buscamos, através de investigações do leito vascular renal *in vivo* e *in vitro*, conhecer melhor seu comportamento frente aos tratamentos tradicionais e investigar possibilidades terapêuticas (como exemplo a inibição dos canais de K⁺) na sepse.

2. HIPÓTESE

Diferentes estudos experimentais demonstram a participação do bloqueio dos canais de efluxo para potássio na reversão dos estados hipodinâmicos encontrados na sepse severa e choque séptico. Assim, com base na limitada investigação e da falta de estudos sobre os efeitos desses bloqueadores em outros órgãos e, em especial no sistema renal, nossa principal hipótese é que o bloqueio dos canais de potássio também pode participar na modulação da reatividade vascular renal em resposta a agentes vasoativos em animais com sepse.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as alterações na reatividade vascular renal e na função renal em ratos com sepse induzida pelo modelo de CLP, e avaliar a participação dos canais de efluxo para potássio na modulação das repostas vasculares renais induzidas por vasoconstritores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar um modelo de sepse severa com disfunção renal;
- Investigar as possíveis alterações na função renal a partir de avaliação de diurese e dosagens bioquímicas;
- Investigar, de maneira simultânea, os efeitos da sepse em variáveis hemodinâmicas como PAM, FSR e RVR em animais anestesiados;
- Determinar os efeitos de drogas vasoconstritoras e inotrópicas na PAM, FSR E RVR, em animais anestesiados;
- Investigar a reatividade vascular renal a agentes vasoconstritores, *in vitro*, em modelo de rim isolado;
- Analisar os efeitos do bloqueio de canais para potássio (TEA ou GLB) na PPR em modelo de rim isolado *in vitro*, e sobre as respostas à fenilefrina e noradrenalina ;
- Conhecer os efeitos de moduladores dos canais para potássio sobre a PAM e FSR basal em animais com sepse induzida por CLP;
- Investigar os efeitos de moduladores de canais para potássio sobre a ação de vasoconstritores na PAM e FSR de ratos com sepse induzida por CLP;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram usados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com idade entre 90 a 120 dias, provenientes dos biotérios da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Até a realização dos experimentos os animais foram mantidos em gaiolas alocadas em salas com temperatura controlada ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), exaustão, e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h). Todos os animais tiveram livre acesso a ração e água. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal da UFSC sob número 00463 e 00566.

4.2. DROGAS E SAIS

Para a execução dos protocolos experimentais foram usadas as seguintes drogas e sais: fenilefrina, noradrenalina, angiotensina II, vasopressina, dobutamina, tetraetilamônio (TEA), glibenclamida (GLB), iberiotoxina (IBTX), minoxidil, NS1619, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KH_2PO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), sulfato de magnésio (MgSO_4), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), D-glucose, EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) (todos da Sigma Aldrich Chemical; St Louis, MO, EUA); xilazina e cetamina (CEVA, Paulínia, SP), heparina (Blausiegel, Cotia, SP). A solução estoque de GLB foi diluída em DMSO. As demais drogas foram diluídas em solução PBS.

4.3 PARTE I: ASPECTOS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL EM MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR CLP

4.3.1. Indução da sepse pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A sepse foi induzida pelo modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP) seguindo a metodologia descrita por Rittirsch *et al.* (2009), com algumas modificações. Os animais foram anestesiados com cetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/Kg (i.p.) e tricotomizados na região abdominal. Após a localização da linha alba foi realizada uma laparotomia mediana de aproximadamente 2 cm. Com o auxílio de material cirúrgico, o ceco e a válvula íleo-cecal foram localizados e retirados da cavidade abdominal. Após esse procedimento, foi realizada uma obstrução parcial do ceco abaixo da válvula íleo-cecal, compreendendo uma obstrução parcial de 75% do ceco (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Na porção distal do ceco foi realizada uma perfuração com agulha 16G (furo transfixante). Após a verificação da saída do material fecal, o ceco foi reposicionado na cavidade abdominal para a realização da sutura da cavidade abdominal. Os animais receberam, imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma reposição subcutânea de PBS estéril (30 ml/ Kg), e foram mantidos em superfície aquecida até a recuperação da anestesia. A maior parte dos procedimentos experimentais foi realizada com os animais 18 horas após a indução da sepse. No entanto, alguns experimentos aconteceram nos tempos de 6 e 36 horas após a indução da sepse, como descrito a seguir. Os animais que permaneceram em estudo até o período de 36 horas receberam uma segunda reposição hídrica (PBS estéril, 30 ml/Kg) 24 horas após a CLP. Os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico.

4.3.2. Curva de sobrevivência

Para essa avaliação, após a indução da sepse por CLP, os animais observados a cada 12 h, durante um período total de 96 h. Os animais que morreram durante o procedimento cirúrgico ou devido aos anestésicos não foram contabilizados para a avaliação da curva de sobrevivência. Com o objetivo de padronizar as características de sepse observadas nestes animais, foram realizadas duas curvas de sobrevivência (n= 8 a 10 animais cada), sendo uma realizada no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (UFSC) e uma segunda realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal (UFPE).

4.3.3. Rim perfundido *in vitro*

Para avaliarmos a resposta do leito vascular renal a agentes vasoativos utilizamos a metodologia de isolamento e perfusão de rins em sistema aberto, onde a solução nutritiva perfunde o leito vascular renal uma única vez. O sistema de perfusão consiste em cinco elementos básicos: i) um sistema de aquecimento, o qual é composto por banho-maria mantido a 37°C e associado a uma bomba d'água portátil; ii) uma bomba peristáltica com um sistema de controle da velocidade de infusão; iii) um transdutor de pressão; iv) uma cuba de 100 ml para órgão isolado, na qual o rim fica mergulhado em solução nutritiva aquecida durante todo o período de experimento e, v) uma cuba de vidro dotada de um sistema de cata-bolhas, de uma serpentina para o aquecimento da solução nutritiva utilizada para a perfusão e ainda três diferentes saídas, a primeira para a perfusão do rim, a segunda para a conexão com o transdutor de pressão e a terceira para a injeção de drogas no sistema. A velocidade de perfusão mantida pela bomba peristáltica durante todo o experimento foi de 4 ml/min.

Após a calibração do sistema, aquecimentos do banho e da cuba contendo a solução nutritiva, os animais, previamente heparinizados (1000 U.I., i.p.), foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), via intraperitoneal. Após a obtenção de um estado de anestesia geral profunda o animal foi colocado

em decúbito dorsal e fixado para a cirurgia. Uma grande incisão era realizada na região média do abdome, possibilitando o acesso a todas as vísceras do animal. Em seguida, o intestino foi cuidadosamente deslocado, permitindo a visualização do rim esquerdo e, após cuidadosa dissecação, de toda a aorta abdominal, bem como da artéria mesentérica e das artérias renais. Durante estes procedimentos as vísceras e, especialmente o rim esquerdo, foram mantidos umedecidos com uma gaze cirúrgica embebida em solução nutritiva de PSS (composição em mM: 118 NaCl; 4,7 KCl; 1,17 MgSO₄; 2,5 CaCl₂·6H₂O; 1,2 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 5,5 glicose). Com o auxílio de um fio cirúrgico o ureter esquerdo foi obstruído, impedindo o fluxo urinário e, conseqüentemente, a produção de urina pelo rim (o que garante a obtenção de um rim não funcional, e perfeitamente responsivo a agentes vasoativos durante um período de até 2 h, suficiente para a realização dos protocolos experimentais propostos). A gordura adjacente ao rim direito, bem como a glândula supra-renal, foram cuidadosamente removidos, para facilitar a remoção do rim e evitar a influência da adrenal sobre o leito vascular renal durante o período de experimentação,. A artéria renal direita e a artéria mesentérica foram igualmente ligadas, impedindo o fluxo sanguíneo para estes leitos. Fios cirúrgicos foram posicionados circundando a aorta abdominal, imediatamente acima e abaixo da artéria renal esquerda. O fluxo sanguíneo na artéria aorta foi interrompido abaixo da artéria renal, sendo que em nenhum momento o rim esquerdo foi exposto a qualquer processo isquêmico. Em seguida, foi inserido e fixado um cateter (Angiocath BD 18G) na aorta, que foi acoplado a uma bomba peristáltica. Logo após o início da perfusão de solução nutritiva, o fluxo sanguíneo da aorta acima da artéria renal esquerda foi totalmente interrompido, e o rim esquerdo removido. Rapidamente, o rim removido do animal foi acondicionado em uma cuba contendo 100 ml da solução nutritiva de PSS, em um sistema totalmente aquecido e mantido na temperatura de 37°C sob um fluxo constante de 4 ml/min. Um período de 40 min foi respeitado antes do início da avaliação experimental. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 Power Lab, ADI Instruments, Austrália).

Protocolo experimental: Com o objetivo de conhecer a reatividade do leito vascular renal nos animais com sepse, foram administradas doses não cumulativas de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol), noradrenalina (1, 3 e 10 nmol) e vasopressina (3, 10 e

30 nmol). Cada droga foi infundida uma vez em cada rim e foi respeitado um intervalo de 15 minutos entre cada dose. Nesta etapa do estudo, foram utilizados os animais em diferentes tempos após a indução da sepse (6, 18 e 36 h). Os resultados de ambos os grupos foram comparados com os animais do grupo controle.

4.3.4 Atividade diurética

Para a determinação da diurese os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais, e o volume de urina foi medido uma única vez após 18 horas. A excreção cumulativa da urina foi calculada em relação ao peso corporal e expressa como ml/100g de peso corporal. Nesses mesmos animais, as amostras de soro e urina foram coletadas, separadas em alíquotas e armazenadas em freezer - 20°C até a realização de dosagens bioquímicas (descritas no item 3.3.5). Adicionalmente foram obtidos fragmentos do tecido renal para a avaliação dos indicadores de estresse oxidativo (descritos no item 3.3.7).

Protocolo experimental: nesta etapa foram avaliados os animais dos grupos controle e CLP 18 h.

4.3.5. Dosagens bioquímicas

Após a avaliação da atividade diurética (conforme descrito anteriormente no item 3.3.4), os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) para a coleta de amostras de sangue. O sangue foi coletado pela aorta abdominal e acondicionado em tubos e centrifugados a 1.000 g (10 minutos, 4°C) para separação do soro. As amostras foram separadas em alíquotas e armazenadas em freezer (-20°C) até a realização das dosagens. No soro foram realizadas as dosagens de creatinina, concentrações de Na⁺ e K⁺ e nitrato/nitrito. Na urina, foram realizados as dosagem das concentrações de Na⁺ e K⁺ e proteinúria.

4.3.5.1 Dosagens de creatinina, eletrólitos (Na^+ e K^+) e proteinúria

A dosagem da creatinina foi realizada a partir de um kit colorimétrico comercial (Labtest, Lagoa Santa, Brasil). As concentrações de Na^+ e K^+ foram mensuradas usando analisador de íons (Modelo AVL 9180-Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A concentração de proteína na urina foi mensurada pelo método de Lowry (1951).

4.3.5.2 Dosagem de nitrato/nitrito(NO_x) séricos

O método de Griess foi utilizado para a dosagem indireta dos níveis de óxido nítrico sérico. As amostras de soro foram desproteinizadas com sulfato de zinco diluído (1:10), incubadas por 1 h a 4°C e centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4°C. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 μM) foram utilizadas para a análise de regressão linear. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras foram incubadas por 3 horas a 37°C em presença da nitrato redutase expressa pela bactéria *Escherichia coli*. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 3000 rpm e 100 μl do sobrenadante foram misturadas com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/ 0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q), em placas de 96 poços, para leitura a 540 nm em um leitor de placas. Após análise por regressão linear, os resultados foram expressos como a concentração de nitrato+nitrito (em μM).

4.3.5.3 Hemograma

O sangue dos animais dos grupos controle e CLP 18 h foi coletado pela veia cava e armazenados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 5%. As amostras foram submetidas imediatamente a análise em contador hematológico automatizado modelo Horiba (ABX®, Micros 60, Montpellier, França) no Laboratório do Óxido Nítrico (Departamento de Farmacologia, UFSC). Os resultados

foram expressos por µl/amostra, com exceção do hematócrito que foi expresso em porcentagem.

4.3.5.4 Indicadores de estresse oxidativo - TBARS e GSH

A mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de OHKAWA et al. (1979). Para isso, fragmentos do rim foram macerados em banho de gelo com 5 ml de KCl 1,15% + EDTA 3 mM/g de tecido. Em seguida, 10 mg de tecido foram adicionados a um meio de reação contendo SDS 0,4%, ácido tricloroacético (TCA) 7,5% e ácido tiobarbitúrico 0,3%. Os tubos de reação foram selados e incubados à 95 °C por 60 min. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de n-butanol para cada volume de reação, e os tubos foram centrifugados a 1000 g por 10 min. A absorbância da fase orgânica foi mensurada em 535 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato e foi expresso como nmol/mg. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Folin (LOWRY et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfidrilas não proteicos (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, 80 a 160 mg de tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS (400 mM), EDTA (4 mM) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) em pH 8,9. A reação ocorreu em temperatura ambiente por 5 minutos, e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato e foi expresso em nmol/mg.

4.4. PARTE II: AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL POR FLUXOMETRIA (FSR_f) E DOS EFEITOS DE AGENTES VASOPRESSORES E INOTRÓPICOS

Nesta etapa do estudo foram utilizados animais do grupo controle e CLP 18 h. Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Renal da UFPE.¹

4.4.1. Fluxo sanguíneo renal por fluxometria (FSR_f)

Esses experimentos foram realizados em animais anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.m.). Após completamente anestesiados, os animais foram acomodados na mesa cirúrgica aquecida, de forma a manter a temperatura corpórea entre 36,5° e 37,0°C. Após a obtenção da anestesia geral, foi realizada laparotomia mediana e, o rim esquerdo foi localizado. Com o auxílio de pinças, a artéria renal foi cuidadosamente separada da veia renal. Uma linha de algodão foi utilizada para auxiliar no isolamento da artéria renal. A leve suspensão do fio, juntamente com uma pequena movimentação da artéria renal permitiu a alocação do fluxômetro (Transpac: Abbott Laboratory, North Chicago, IL, USA). O fluxômetro (Figura 2), envolve a artéria renal e a partir de dois transdutores opostos mede o volume de fluxo que passa pela vaso. Esse fluxômetro é conectado a um polígrafo digital e sistema de aquisição de dados específico (PowerLab e software LabChart, ambos da ADI Instruments, Austrália). Após um período de estabilização de 40 a 60 min foram realizadas as mensurações basais do FSR. Após a realização do procedimento experimental o rim esquerdo foi removido, seco em papel filtro e pesado em balança de precisão. Os valores de FSR são expressos por ml/min/g de rim.

¹ Os experimentos realizados no laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal da UFPE foram realizados sob a supervisão da Prof^a. Dr^a Ana Durce Oliveira da Paixão

Para avaliar a resistência vascular renal (RVR) foi realizada a medida da pressão arterial pelo método direto. Os mesmos animais foram utilizados para a medida do FSR e da PAM. Nesse sentido, após tricotomia da região inguinal, foi feita uma incisão para dissecação, isolamento e canulação da artéria e da veia femoral. Cânulas de polietileno (P10 e P20, respectivamente), preenchidas com solução fisiológica heparinizada, foram introduzidas na artéria e veia femoral. A cânula arterial foi acoplada a um transdutor de pressão. Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um polígrafo amplificador de sinais (PowerLab, ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (LabChart v7.00, ADI Instruments, Austrália). Antes de cada medida, o transdutor foi calibrado através de um manômetro de mercúrio. Após um período de estabilização, os níveis de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram mensurados continuamente ao longo dos experimentos. A FC foi calculada automaticamente pelo *software* a partir da detecção dos picos da pressão sistólica do registro da pressão arterial.

A resistência vascular renal (RVR) foi calculada de acordo com a seguinte equação: $RVR = PAM/FSR$, onde RVR corresponde à resistência vascular renal, PAM à pressão arterial média, e FSR ao fluxo sanguíneo renal. Estes dados foram corrigidos pelo peso (grama) do rim correspondente. A RVR foi expressa como mm Hg/ml/min/g de rim. Ao final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através de uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/Kg i.v.).

Protocolo experimental: após o período de estabilização (de aproximadamente 40 - 60 minutos), os valores basais de PAM e FSR foram registrados. Em seguida os animais dos grupos controle e CLP 18 h receberam fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg) ou dobutamina (3, 10 e 30 nmol/Kg) ou angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg), ou vasopressina (3, 10 e 30 pmol/Kg), ou noradrenalina (1, 3 e 10 nmol/Kg), administradas *in bolus*, pela via intravenosa. As administrações foram feitas com intervalo de 15 minutos entre cada dose. Cada animal recebeu apenas uma droga, sendo as medidas da PAM e do FSR realizadas simultaneamente. Os valores de RVR foram obtidos após os experimentos e calculados conforme descrição anterior.

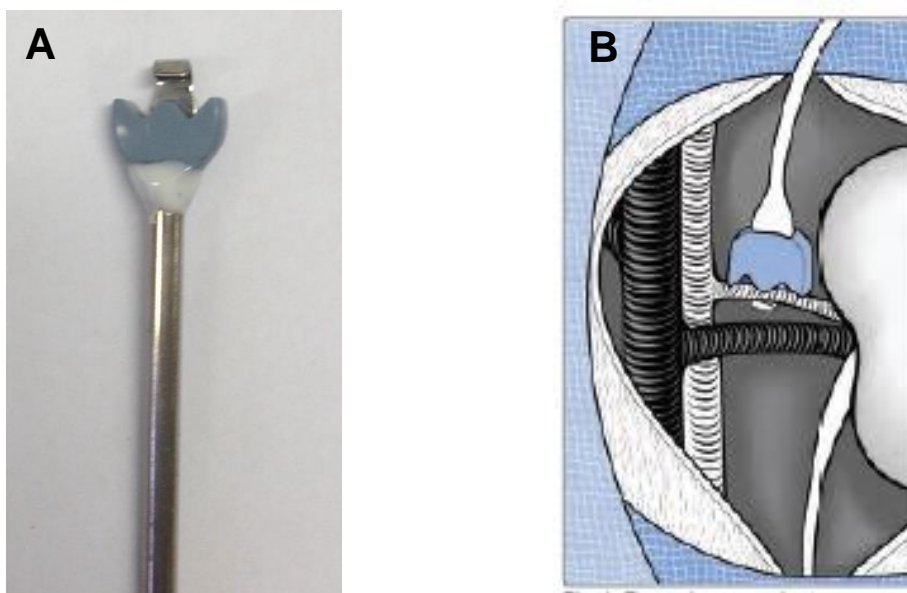


Figura 2. (A) Foto do fluxômetro utilizado no presente estudo. (B) Ilustração do posicionamento do fluxômetro na artéria renal (FONTE: Transonic System, em www.transonic.com)

4.5. PARTE III: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MODULADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL E FSR

4.5.1 Rim perfundido *in vitro*

Os procedimentos para isolamento e manutenção do rim em sistema de perfusão estão descritos no item 3.3.3. Nesta etapa do estudo foram utilizados animais dos grupo controle e CLP 18 h.

Protocolo experimental: Após o período de estabilização, foi avaliado o efeito dos inibidores de canais de potássio na responsividade renal². Para isso, após a avaliação dos efeitos dos agentes vasoconstritores fenilefrina (30 nmol) e noradrenalina (10 nmol) na PPR, foi adicionado TEA (1 mM), um inibidor não seletivo de canais de K⁺, ou a GLB (40 µM), um inibidor específico dos canais os K_v6.1-6.2, no líquido de perfusão, sendo repetida a administração dos vasoconstritores nas concentrações descritas acima. Foram utilizados um vasoconstritor e um bloqueador de canal de potássio por rim/animal, sendo que a

² Esses experimentos foram realizados nas mesmas preparações descritas anteriormente, e estão separados com a finalidade de ilustrar melhor os achados apresentados neste trabalho.

administração do vasoconstritor foi realizada duas vezes no mesmo rim, sendo uma antes e outra na presença do bloqueador de canal de potássio (TEA ou GLB).

4.5.2. Avaliação do fluxo sanguíneo renal por laser Doppler (FSR_{LD})

Nestes experimentos, devido ao longo tempo de estabilização exigida pelo fluxômetro, o laser Doppler foi utilizado para a obtenção do FSR_{LD}. O uso do laser Doppler para medida de fluxo sanguíneo foi descrito em detalhes por Flemming et al. (2000), sendo seguido neste estudo com algumas modificações. Para a medida do fluxo sanguíneo renal, uma sonda de fibra ótica (Modelo VP1) (ilustração na Figura 3A), conectado com um sistema *Laser Doppler* (DP2b, Moor Instruments) (Figura 3B) foi colocada sobre a superfície dorsal do rim e este foi protegido com gazes umedecidas em solução salina estéril. O sistema laser Doppler fornece um sinal, em unidades arbitrárias, proporcional ao produto da velocidade de hemossedimentação e concentração num pequeno volume de tecido. No rim, o sinal reflete predominantemente a velocidade de hemossedimentação. Um período de 20 min de equilíbrio foi permitido antes dos protocolos experimentais iniciarem. Através de um acesso venoso obtido conforme descrição apresentada anteriormente, foram administradas drogas vasoativas.

Nestes experimentos os mesmos animais tiveram a PAM avaliada, de forma semelhante à descrita no item 3.4.1. No entanto, a pressão arterial foi mensurada através de canulação da artéria carótida (e não na femoral como nos experimentos anteriores). A FC, assim como nos experimentos anteriores, foi calculada automaticamente pelo *software* a partir da detecção dos picos da pressão sistólica do registro da pressão arterial.

Protocolo experimental: Foram avaliados os efeitos dos bloqueadores de canais de potássio TEA, GLB, e IBTX, bem como dos abridores de canais de potássio minoxidil e NS1619, nos efeitos de vasoconstritores sobre a PAM e o FSR *in vivo*. Para isso, ao final do procedimento cirúrgico e transcorrido o tempo de estabilização, foi realizada a administração intravenosa, de fenilefrina (30 nmol/Kg), seguida da noradrenalina (10 nmol/Kg). Após o término dos efeitos gerados por esses

vasoconstritores, diferentes animais foram tratados com TEA (360 $\mu\text{mol/Kg}$), ou GLB (40 $\mu\text{mol/kg}$), ou IbTX (dose, 0,3 nmol/ min//5 min), ou minoxidil (10 $\mu\text{mol/kg}$), ou NS1619 (30 nmol/Kg), todos administrados por via intravenosa (veia femural), seguidos por uma nova administração de fenilefrina e noradrenalina nas doses citadas. Um resumo do protocolo experimental e um registro típico da PAM e FSR_{LD} obtidos em um animal do grupo controle pode ser visualizada na Figura 4. Em uma sequência adicional de experimentos, os efeitos da inibição de canais de potássio por GLB e IBTX, na resposta da angiotensina II também foi avaliada, seguindo o mesmo protocolo e dosagens citados anteriormente.

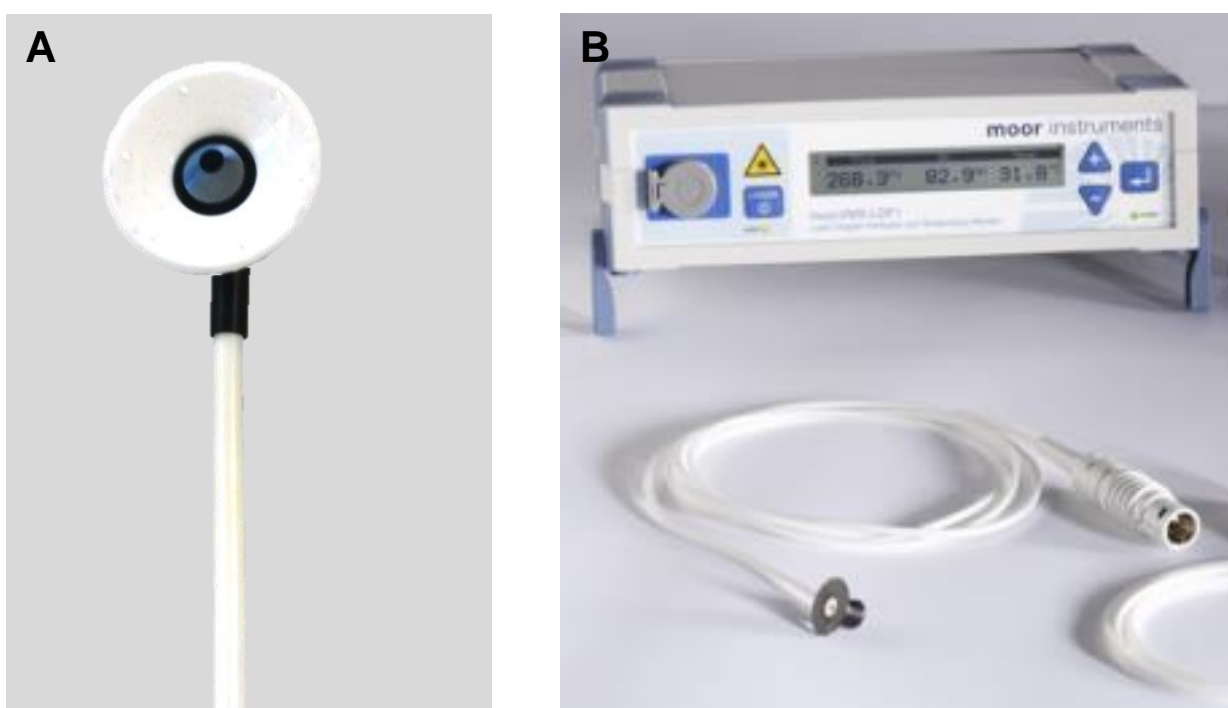


Figura 3: (A) Probe de fibra ótica (Modelo VP1). (B) Probe e sistema Laser Doppler (DP2b, Moor Instruments). Fonte: Moor Instruments (em www.moor.com.uk).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média ($n= 6$ animais em cada grupo). Para a análise estatística foi utilizado o teste t de Student para amostras pareadas ou não-pareadas, ou a análise de variância de uma via

(ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Dunnet, quando aplicáveis. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p menor que 0,05. Os gráficos foram construídos e as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

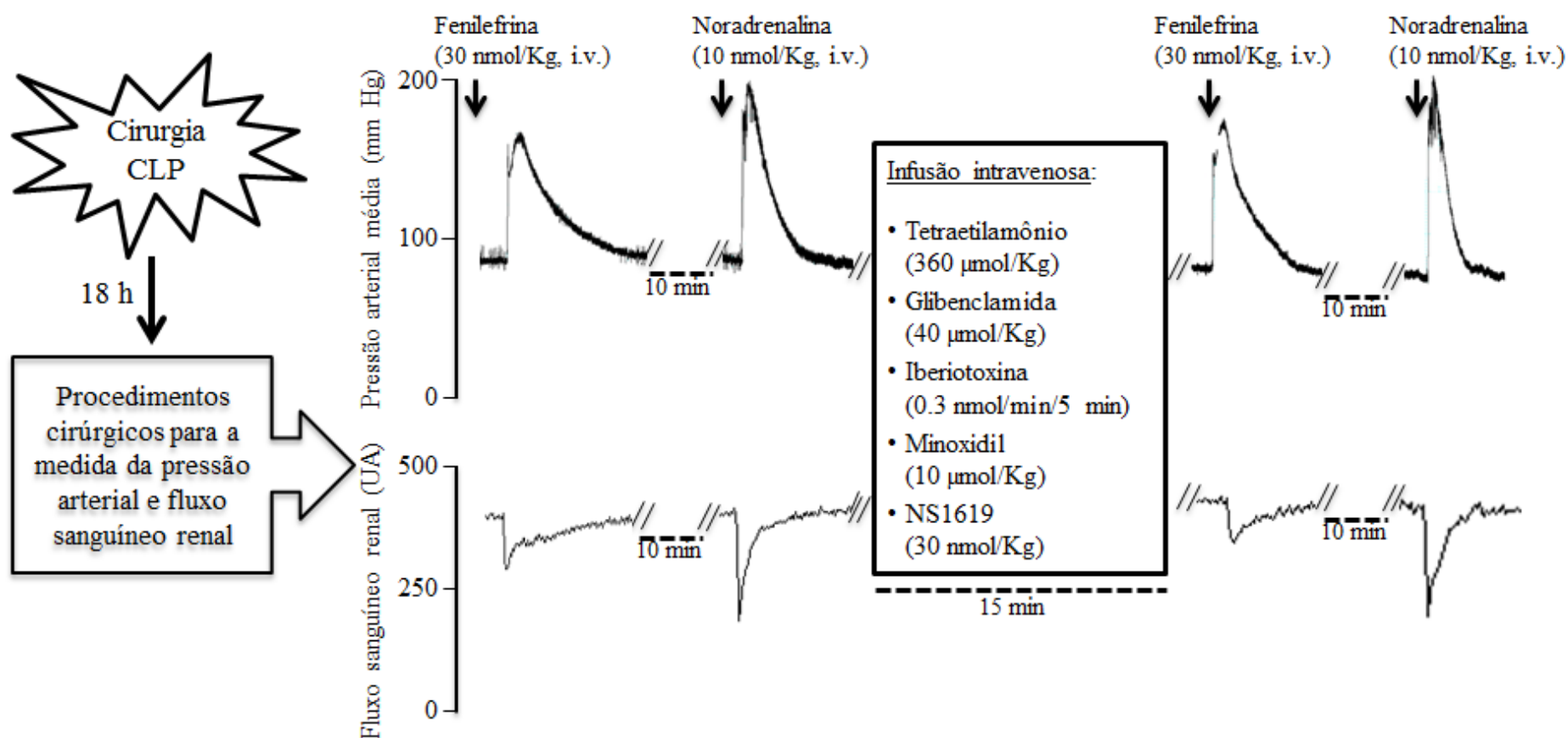


Figura 4. Registro típico e protocolo experimental seguido da medida simultânea da pressão arterial média e do fluxo sanguíneo renal pelo laser Doppler em animais anestesiados. Os registros demonstram a administração intravenosa de fenilefrina (30 nmol/Kg) e noradrenalina (10 nmol/Kg), antes e depois da administração do bloqueador de canal de K^+ , tetraetilamônio. No retângulo entre os registros típicos, estão os moduladores de canais de K^+ usado neste estudo. Somente um modulador de K^+ foi administrado por animal. Esses experimentos foram realizados nos animais do grupo controle e CLP 18 h.

5. RESULTADOS

5.1. PARTE I: ASPECTOS GERAIS E CARACTERIZAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL EM MODELO DE SEPSE POR CLP

5.1.1 Curva de sobrevivência

Com o objetivo de determinar qual tempo após a indução da sepse seria utilizado para o presente estudo, algumas avaliações foram realizadas. Uma delas foi a curva de sobrevivência, um parâmetro muito utilizado para auxiliar na avaliação da severidade da sepse obtida pelo modelo de CLP. Os resultados demonstraram (Figura 5) que, da forma realizada e padronizada neste estudo, a cirurgia de CLP causou a morte de 25% dos animais em 24 horas, e 67% em 48 horas após o procedimento.

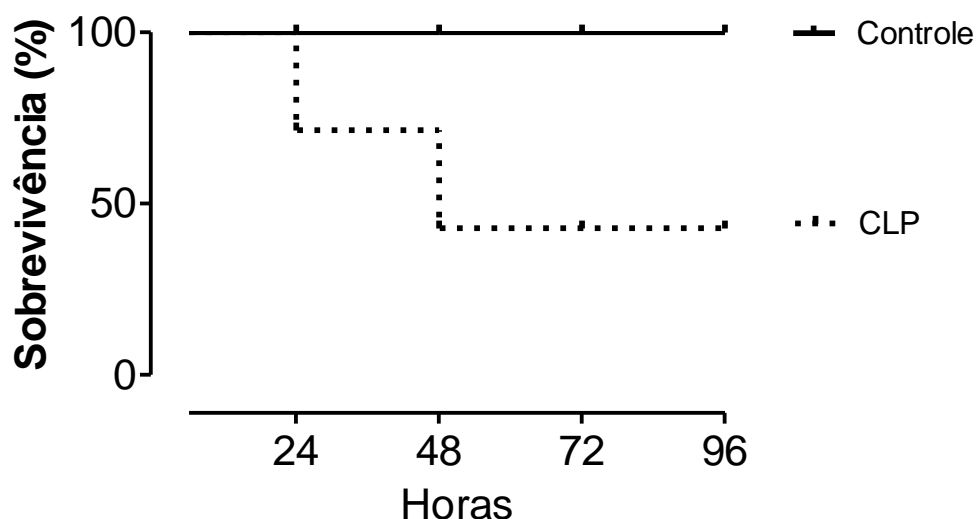


Figura 5. Curva de sobrevivência dos animais após a indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Os animais foram monitorados a cada 12 horas durante 96 horas (n= 8). Resultados são expressos em % de sobrevivência. $p < 0,05$ grupo experimental quando comparados entre si (teste de Mantel-Cox).

5.1.2 Caracterização da reatividade vascular renal em modelo de sepse por CLP

Com o objetivo de rastrear um tempo após a sepse que caracterizasse alterações na reatividade renal, os experimentos iniciais foram conduzidos com os grupos CLP 6 h, CLP 18 h e CLP 36 h, sendo os valores dos mesmos comparados com os animais do grupo controle. Foi avaliada a reatividade renal para a noradrenalina, fenilefrina e vasopressina.

5.1.2.1 Alterações na reatividade do leito vascular renal *in vitro* para a noradrenalina, fenilefrina e vasopressina durante a sepse induzida por CLP

Nossos resultados mostram que a redução da resposta do leito vascular renal para a noradrenalina nos animais com sepse pôde ser observada a partir do tempo de 6 h após a indução da sepse, conforme representado pela Figura 6A, permanecendo reduzida por até 36 h após a indução da sepse (Figura 6C). Nos animais do grupo CLP 18 h a responsividade do leito vascular renal para a noradrenalina estava significativamente reduzida em comparação com a resposta dos animais do grupo controle (Figura 6B). O aumento na pressão de perfusão vascular renal (PPR) em resposta à noradrenalina nos rins de animais controle foi de $68,1 \pm 16,9$ mm Hg, $143,2 \pm 25,6$ mm Hg, $204,1 \pm 20,9$ mm Hg, para as doses de 1, 3 e 10 nmol, respectivamente, enquanto em animais do grupo CLP 18 h, essas mesmas doses, elevaram a pressão de perfusão em $38,6 \pm 8,0$, $70,2 \pm 16,4$, e $89,5 \pm 18,3$ mm Hg (Figura 6B). A análise da área sob a curva revelou o mesmo perfil de resultados, porém com uma redução na reatividade à noradrenalina mais expressiva nos animais do grupo CLP 18 h (Tabela 3).

De forma semelhante ao observado para a noradrenalina, a reatividade renal para a fenilefrina no grupo CLP 18 h estava significativamente reduzida em comparação com os animais do grupo controle, conforme pode ser visualizado na figura 7B. Porém, os animais do grupo CLP 6 h não demonstraram diferença no aumento da PPR em relação ao grupo controle (Figura 7A). Por sua vez, nos

animais do grupo CLP 36 h, apenas a concentração de 30 nmol de fenilefrina teve seu efeito significativamente reduzido em comparação com o grupo controle (Figura 7C). Da mesma forma, a análise da área sob a curva permitiu confirmar a redução da resposta à fenilefrina nos animais dos grupos experimentais CLP 18 e CLP 36 h, em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Ao contrário da fenilefrina e da noradrenalina, o efeito da vasopressina na PPR foi maior no grupo CLP 18 h, quando comparado com o grupo controle (Figura 8B). Adicionalmente, no tempo de 6 horas após a sepse, não foi observada diferença da resposta do leito vascular renal para a vasopressina, em comparação com os animais do grupo controle (Figura 18A). Entretanto, o aumento da resposta da PPR para a vasopressina permaneceu após 36 horas da indução da sepse (grupo CLP 36 h); porém, esse aumento foi observado apenas para a concentração de 30 pmol (Figura 18C). Ratificando esses achados, os efeitos da vasopressina, sob a análise da área sob a curva, mostraram aumentados no grupo CLP 36 h apenas para a dose de 30 pmol (Tabela 3).

Em virtude dos resultados obtidos, nos quais o grupo CLP 18 h revelou alterações na reatividade vascular para os três agentes vasoconstritores estudados, as próximas etapas deste estudo foram realizadas exclusivamente com os grupos CLP 18 h e controle.

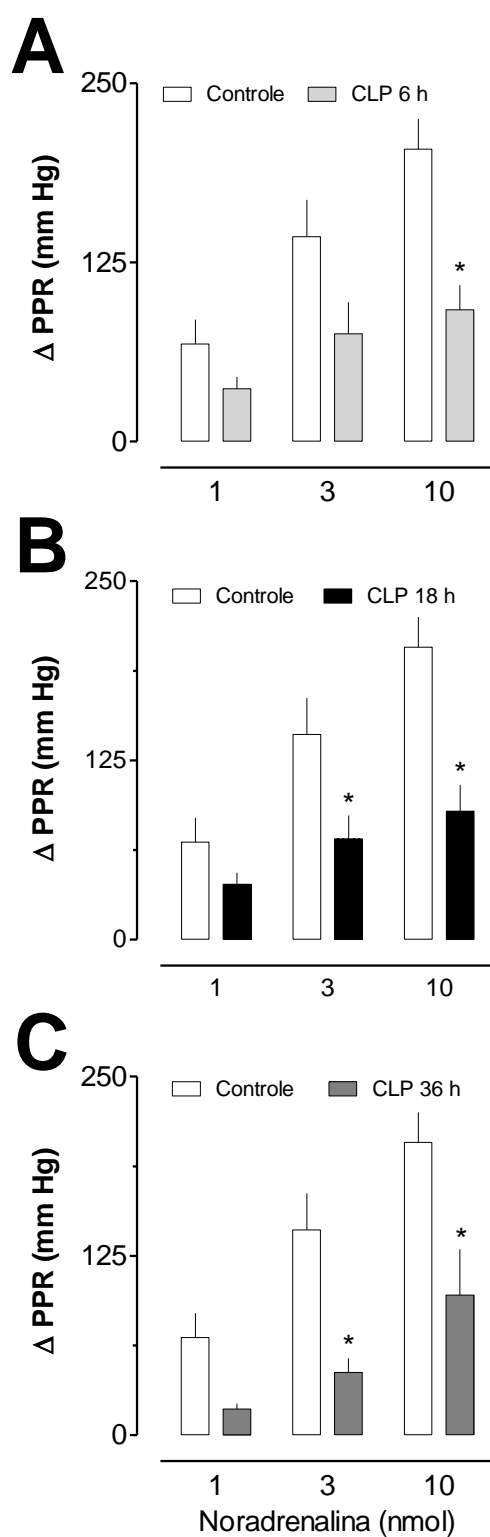


Figura 6. Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela noradrenalina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta, em A, B e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C). Os gráficos expressam a média do delta da PPR \pm erro padrão da média, referentes a um n = 4 a 8 animais por grupo. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

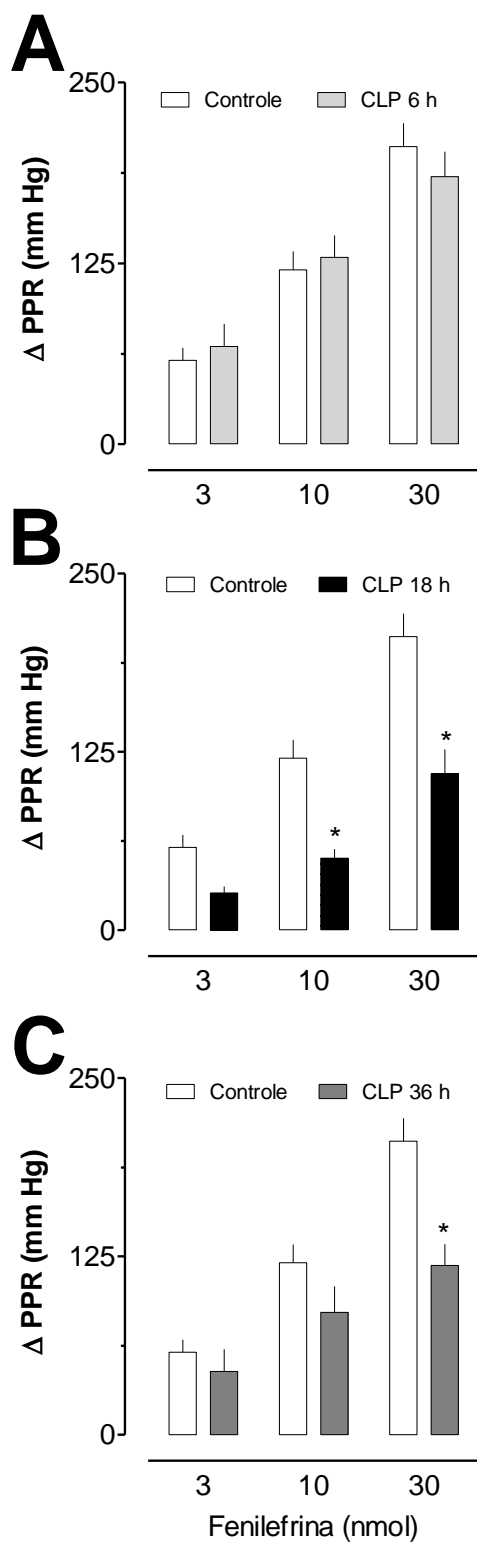


Figura 7. Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela fenilefrina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta em A, B e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C). Os gráficos expressam a média do delta da PPR \pm erro padrão da média, referentes a um n = 4 a 8 animais por grupo. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

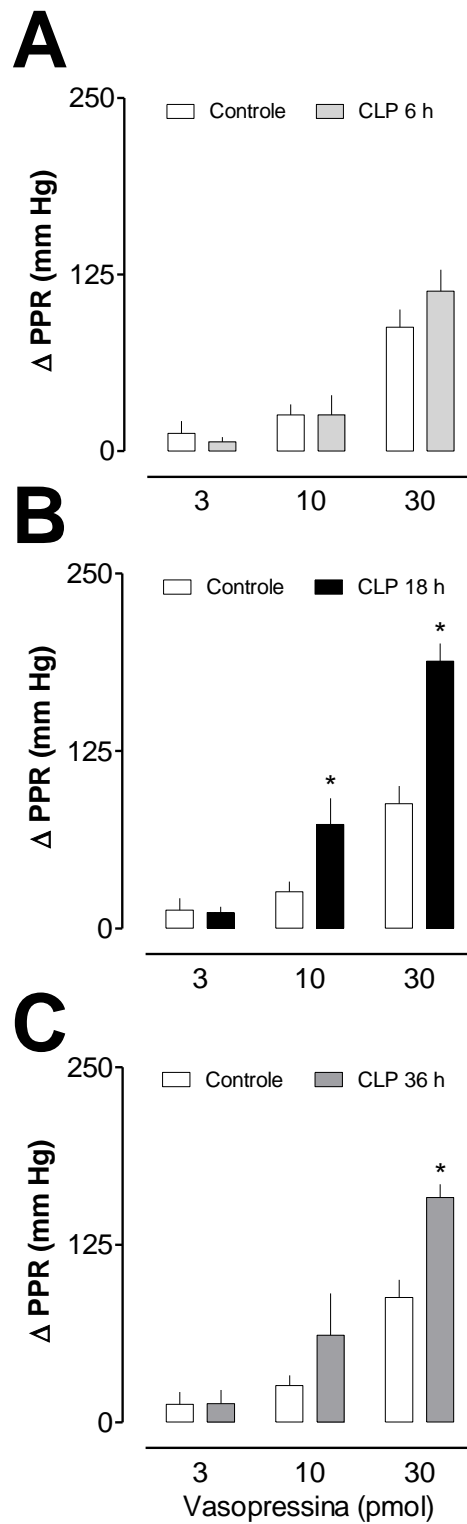


Figura 8. Aumento da pressão de perfusão renal (PPR) induzida pela vasopressina, em rim isolado perfundido nos animais do grupo controle (barra aberta em A, B e C), grupo CLP 6 h (A), grupo CLP 18 h (B), grupo CLP 36 h (C). Os gráficos expressam a média do delta da PPR \pm erro padrão da média, referentes a um n = 4 a 8 animais por grupo. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Tabela 3. Área sob a curva dos efeitos dos vasoconstritores na pressão de perfusão renal (PPR) em modelo de rim isolado *in vitro*, de animais controle e com sepse.

Agente		Área sob a curva (unidades arbitrárias)			
vasoconstritor		Controle	CLP 6 h	CLP 18 h	CLP 36 h
Noradrenalina (nmol/Kg)	1	4158 ± 554	1574 ± 522	2132 ± 483	857 ± 174
	3	7173 ± 1076	4856 ± 1777	3751 ± 981	3282 ± 1295
	10	11936 ± 1561#	8132 ± 2273#	6974 ± 1440*	7965 ± 3068#
Fenilefrina (nmol/Kg)	3	2686 ± 398,6	3361 ± 597	820 ± 165	2582 ± 819
	10	7339 ± 958,6	8599 ± 875	3302 ± 807	5505 ± 1430
	30	20147 ± 4196#	16193 ± 1561#	5885 ± 1299*	8474 ± 1808*
Vasopressina (pmol/Kg)	3	657 ± 364	1293 ± 604	1164 ± 464	4589 ± 1609
	10	4245 ± 1140	4862 ± 2381	14848 ± 5193	12631 ± 3851
	30	21437 ± 5968#	20564 ± 1989#	29862 ± 5391#	43467 ± 9773,0*#

Os valores são médias ± erro padrão da média referentes a um n = 4 a 8 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnett* respectivamente. * p < 0,05 em relação ao grupo controle para as mesmas doses. # p < 0,05 em relação a menor dose intra-grupo.

5.1.3. Avaliação de parâmetros bioquímicos e aspectos funcionais renais no modelo de sepse por CLP

Além das alterações encontradas na reatividade vascular renal no tempo de 18 h após a indução da sepse, pela cirurgia de CLP, verificamos um aumento significativo nos níveis de NO_x no plasma desses animais (Figura 9A), o que foi acompanhado de leucopenia e redução no número total de linfócitos (Tabela 4).

Além dos fatores séricos, a caracterização do modelo de sepse baseia-se na avaliação de parâmetros hemodinâmicos e renais que demonstraram semelhança com os achados clínicos em pacientes com sepse severa. Por exemplo, a PAM dos animais no grupo CLP 18 h foi de $52,03 \pm 4,59$ mm Hg (Figura 9B), enquanto em animais do grupo controle foi de $82,17 \pm 3,48$ mm Hg (Figura 9B), revelando uma redução de aproximadamente 35% na PAM dos animais com sepse. Por outro lado, em nossos experimentos os valores de frequência cardíaca não foram diferentes entre os grupos controle e CLP 18 h (Tabela 7).

Do ponto de vista de função renal, verificou-se uma redução do volume urinário e elevação dos níveis séricos de creatinina (Figura 10A e B, respectivamente). Entretanto, a proteinúria, um marcador de dano glomerular, estava significativamente reduzida nos animais do grupo CLP 18 h ($9,20 \pm 1,53$ ml/Kg/18 horas), quando comparada aos valores obtidos em amostras de animais do grupo controle ($22,40 \pm 0,60$ ml/Kg/18 horas), conforme mostrado na Figura 10C.

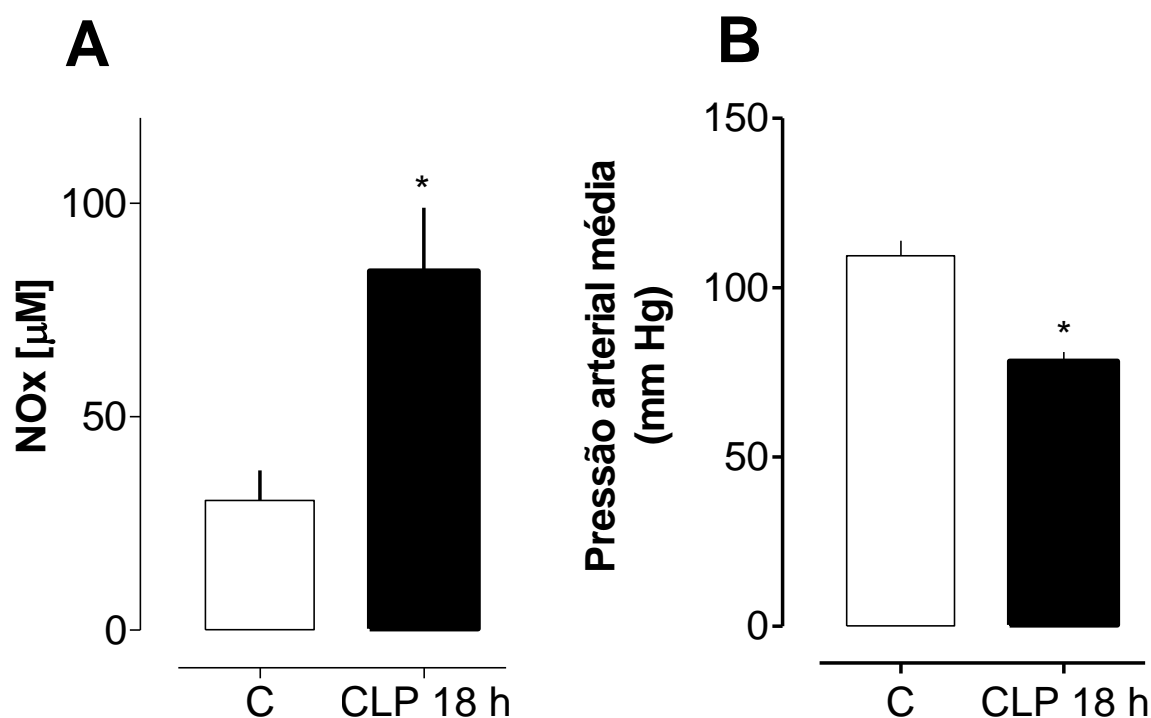


Figura 9. Elevação da concentração plasmática de nitrato e nitrito (NO_x) e redução dos níveis pressóricos em animais do grupo CLP 18 h. (A) Concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito (NO_x) em animais do grupo controle e CLP 18h. (B) Pressão arterial média (PAM) em animais do grupo controle e CLP 18 h. Os valores apresentados expressam a média de valores \pm erro padrão da média ($n= 5$ a 9 animais). A análise estatística usada entre os grupos foi o teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Tabela 4. Parâmetros hematológicos dos animais do grupo controle e CLP 18 h

	Controle	CLP 18 h
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	14,10 \pm 1,12	6,82 \pm 1,65*
Hemoglobina ($10^3/\mu\text{L}$)	13,12 \pm 0,54	15,66 \pm 1,41
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	858,40 \pm 94,95	644,0 \pm 60,6
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,20 \pm 1,23	2,00 \pm 1,07*
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,53 \pm 0,46	1,96 \pm 0,71
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	1,66 \pm 0,39	2,82 \pm 0,60
Hematócrito (%)	47,42 \pm 2,20	53,40 \pm 3,68

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média de amostras coletadas de 5 a 7 animais por grupo. A análise estatística usada entre os grupos foi o teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

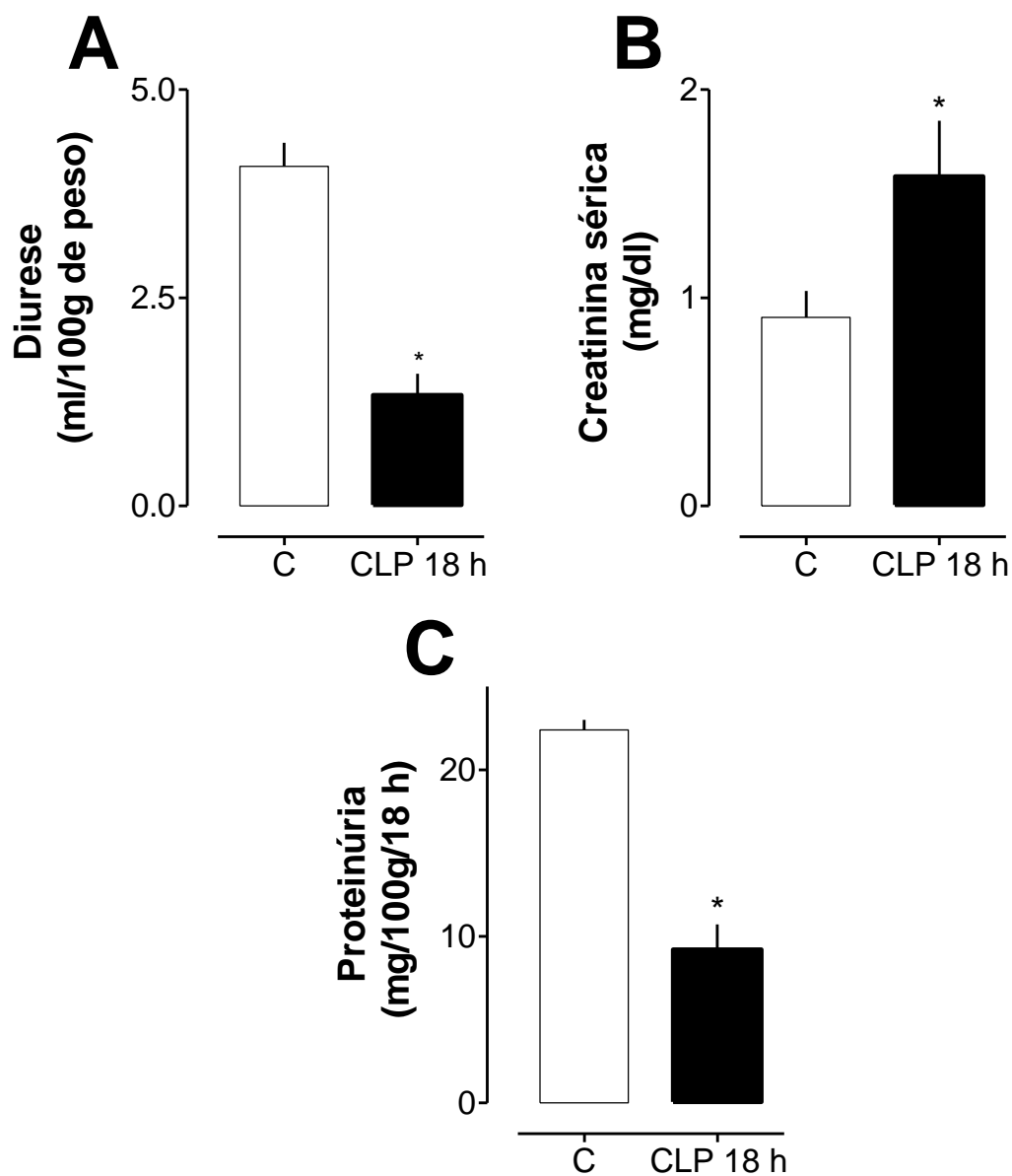


Figura 10. Alterações em parâmetros funcionais renais nos animais com sepse. Efeito da sepse após 18 horas de indução por CLP na diurese (A), creatinina sérica (B), proteinúria (C). Os valores apresentados expressam a média de valores \pm erro padrão da média (n= 5 a 9 animais). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise estatística usada entre os grupos foi o teste *t* de *Student*.

Índices elevados de estresse oxidativo estão diretamente relacionados com a disfunção de diversos órgãos (SEIJA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). Homogenatos do tecido renal dos animais com sepse (grupo CLP 18 h), mostraram valores elevados de peroxidação lipídica, mensuradas através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), quando comparadas com o grupo controle (Tabela 5). Da mesma forma, os níveis de GSH em homogenatos de tecido renal nos animais do grupo CLP 18 h também foram maiores comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de peroxidação lipídica por mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e níveis de glutathiona reduzida (GSH), em homogenatos de rim.

	Controle	CLP 18 h
TBARS/rim (nmol/mg)	0,62 ± 0,14	1,20 ± 0,23*
GSH/rim (nmol/mg)	58,36 ± 9,48	88,08 ± 6,42*

Os valores foram expressos em média ± erro padrão da média de amostras de 5 a 7 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por meio do test *t* de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Considerando a importância do sistema renal no balanço eletrolítico do organismo, nós realizamos a quantificação dos eletrólitos séricos e urinários. Foram observadas alterações significativas nos níveis de eletrólitos dos animais do grupo CLP 18 h, como pode ser observada na Tabela 6. Nos animais do grupo CLP 18 h os níveis séricos de sódio estavam significativamente reduzidos; por outro lado, os níveis de potássio séricos estavam elevados nesses mesmos animais, caracterizando um quadro de hipercalemia. De maneira similar, a excreção de eletrólitos também foi afetada pela sepse (Tabela 6). Tanto a excreção de sódio quanto de potássio estava significativamente reduzida nos animais do grupo CLP 18 h, em comparação com os animais do grupo controle.

Tabela 6. Concentração sérica e urinária dos íons sódio e potássio nos animais dos grupos controle e CLP 18 h.

	Controle	CLP 18 h
[Na ⁺] sérico (nmol/l)	142,70 ± 1,03	132,20 ± 1,46 *
[K ⁺] sérico (nmol/l)	5,45 ± 0,31	8,05 ± 0,65 *
[Na ⁺] urinário (nmol/l/100g/18 h)	0,32 ± 0,04	0,05 ± 0,01 *
[K ⁺] urinário (nmol/l/100g/18 h)	3,14 ± 0,50	0,78 ± 0,15 *

Os valores apresentados expressam a média ± erro padrão da média. A análise estatística usada entre os grupos foi o teste *t* de Student. * *p* < 0,05 em relação ao grupo controle.

5.2 PARTE II: EFEITOS SISTÊMICOS E RENAIIS DE AGENTES VASOCONSTRITORES E INOTRÓPICOS EM ANIMAIS ANESTESIADOS

A próxima etapa do nosso estudo teve como objetivo conhecer os efeitos de agentes vasoconstritores e inotrópicos, *in vivo*, na PAM e FSR_f dos animais com sepse. Nos experimentos descritos anteriormente, observou-se que o grupo CLP 18 h apresentou hiporreatividade do leito vascular renal e alterações na função renal; por isso, a partir dessa etapa passamos a trabalhar apenas com o grupo experimental CLP 18 h e o grupo controle.

Os resultados das avaliações *in vivo* contribuíram para a caracterização de um modelo de sepse com disfunção renal. No grupo CLP 18 h, além da hipotensão (Figura 11A), o fluxo sanguíneo renal por fluxometria (FSR_f) revelou-se significativamente reduzido (2,14 ± 0,12 ml/min), quando comparado com o registrado em animais do grupo controle (6,51 ± 0,69 ml/min), caracterizando uma diminuição maior que 60% no FSR_f dos animais com sepse (Figura 11C). A RVR mostrou-se significativamente elevada nos animais do grupo CLP 18 h (12,72 ± 2,51 mm Hg/ ml/min/g de rim), quando comparada com valores obtidos nos animais do grupo controle (26,31 ± 2,95 mm Hg/ ml/min/g de rim) (Figura 11D). Nesses experimentos, animais do grupo CLP 18 h não apresentaram alterações na FC (Figura 11B).

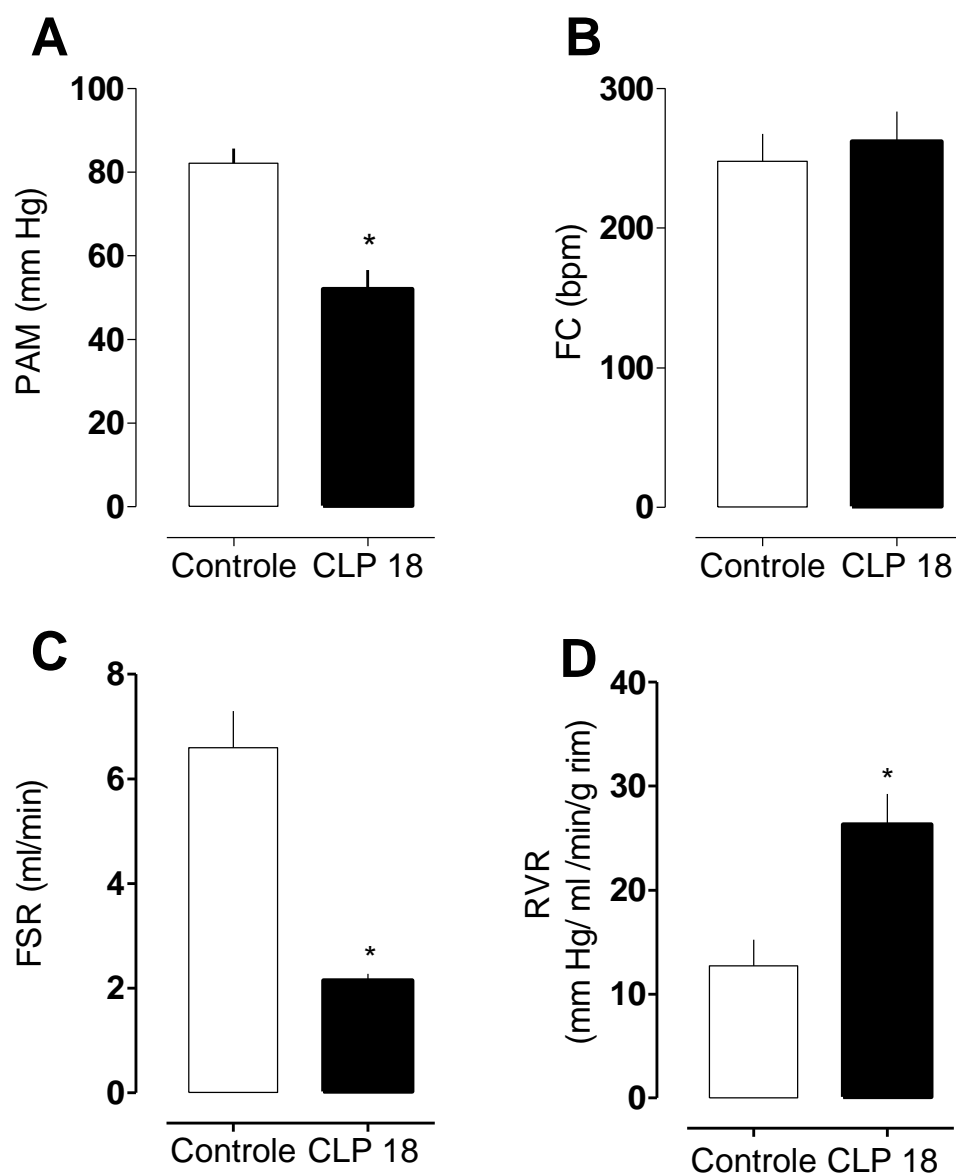


Figura 11 . Alterações de parâmetros hemodinâmicos e renais em animais com sepse induzida por CLP (Grupo CLP 18 h). (A) pressão arterial média (PAM), (B) frequência cardíaca (FC), (C) fluxo sanguíneo renal por fluxometria (FSR_f), (D) resistência vascular renal (RVR). Os valores apresentados mostram a média \pm erro padrão da média. A análise estatística usada entre os grupos foi o teste *t* de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Além de conhecer os efeitos dos agentes vasoconstritores e inotrópicos nos animais com sepse, a obtenção simultânea da PAM e do FSR nos permitiu comparar os efeitos sistêmicos (via alterações na PAM) e renais (por modificações no FSR_f e RVR) desses agentes.

Frente à significativa hipotensão e redução do FSR_f observada nos animais do grupo CLP 18 h, um dos objetivos dessa etapa foi observar se algum dos agentes utilizados restaurava os níveis de pressão arterial assim como o FSR nesses animais. De um modo geral somente a noradrenalina e a vasopressina foram capazes de elevar os níveis de PAM nos animais do grupo CLP 18 h para valores semelhantes aos observados no grupo controle. Além disso, nenhum dos agentes vasoconstritores e inotrópicos utilizados foi capaz de elevar o FSR e reduzir a RVR nos animais com sepse.

Em uma análise mais detalhada dos efeitos dos agentes vasoconstritores e inotrópicos, foi possível observar que a noradrenalina, um dos agentes de primeira escolha do choque séptico, causou elevação da PAM e RVR, tanto no grupo CLP 18 h quanto no grupo controle (Figura 12A e C respectivamente). Entretanto, a duração do efeito da noradrenalina na PAM nesses animais foi significativamente menor em comparação ao grupo controle (Tabela 8). É importante notar que nos animais com sepse, a maior dose de noradrenalina (10 nmol/Kg) além de não representar efeito hipertensor semelhante ao observado no grupo controle, foi responsável por significativo aumento na RVR desses animais, conforme pode ser observado na Figura 12C. No FSR, assim como previamente observado nos ensaios *in vitro* com rim perfundido foi observada uma significativa hiporreatividade renal para a noradrenalina nos animais do grupo CLP 18 h (Figura 12B). Os valores de FC após a administração da noradrenalina nos animais com sepse estavam significativamente maiores em comparação com os animais do grupo controle (Tabela 7).

Os resultados obtidos com a administração intravenosa de fenilefrina e seus efeitos sobre a PAM, FSR e RVR em animais dos grupos controle e CLP 18 h estão representados na Figura 13. Como esperado, no grupo controle a administração de fenilefrina elevou os níveis de PAM e RVR, e reduziu o FSR_f (Figura 13A, C e B respectivamente). Por outro lado, no grupo CLP 18 h, foi observada uma significativa hiporreatividade tanto na PAM quanto no FSR, para a ação da fenilefrina (Figura 13A e B respectivamente). Nesse sentido, na PAM dos animais do grupo CLP 18 h, nas 3 doses avaliadas, apresentaram respostas à fenilefrina significativamente reduzidas, em comparação ao grupo controle (Figura 13A), inclusive quando o tempo de duração das respostas foi avaliado (Tabela 8). Assim como observado nos

ensaios *in vitro*, o FSR dos animais do grupo CLP 18 h revelou uma significativa hiporreatividade para fenilefrina (Figura 13B). Entretanto, na análise da duração do efeito da fenilefrina no FSR_f , não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 8). A figura 13C mostra os efeitos na administração de fenilefrina na análise da RVR, no qual podemos observar um aumento da RVR tanto nos animais do grupo controle como do grupo CLP 18, em especial na dose de 30nmol/Kg. A fenilefrina não alterou a FC no grupo controle ou no grupo CLP 18 h (Tabela 7).

Além dos efeitos dos agentes vasoconstritores, nós investigamos os efeitos da dobutamina, um clássico agente inotrópico, na PAM, FSR_f e RVR dos animais com sepse. A administração de dobutamina não alterou significativamente os valores de PAM, FSR_f e RVR no grupo controle ou no CLP 18 h (Figura 14A, B e C respectivamente). Por outro lado, a dobutamina, elevou, de forma semelhante a FC tanto no grupo controle como CLP 18 h (Tabela 7).

Um outro agente vasoconstritor usado no tratamento da disfunção vascular na sepse é a vasopressina. A figura 15 mostra os efeitos da administração intravenosa de vasopressina na PAM, FSR_f e RVR nos animais com sepse. Assim como observado com a noradrenalina, a vasopressina também elevou os níveis pressóricos dos animais do grupo CLP 18 h (Figura 15A). Como pode ser visualizada na Figura 15A, a administração da vasopressina foi capaz de elevar os valores da PAM nos animais com sepse (grupo CLP 18 h) para valores semelhantes aos atingidos pelos animais do grupo controle. Da mesma forma, a duração do efeito da vasopressina na PAM foi semelhante entre os grupos controle e CLP 18 h (Tabela 8). Ao contrário do que evidenciamos nos ensaios *in vitro*, a administração de vasopressina não alterou o FSR_f nos animais do grupo CLP 18 h ou no grupo controle (Figura 15B), bem como a duração do seu efeito (Tabela 8). De forma diferente ao observado nos animais do grupo controle, a RVR foi significativamente elevada pela administração da vasopressina nos animais do grupo CLP 18 h (Figura 15C).

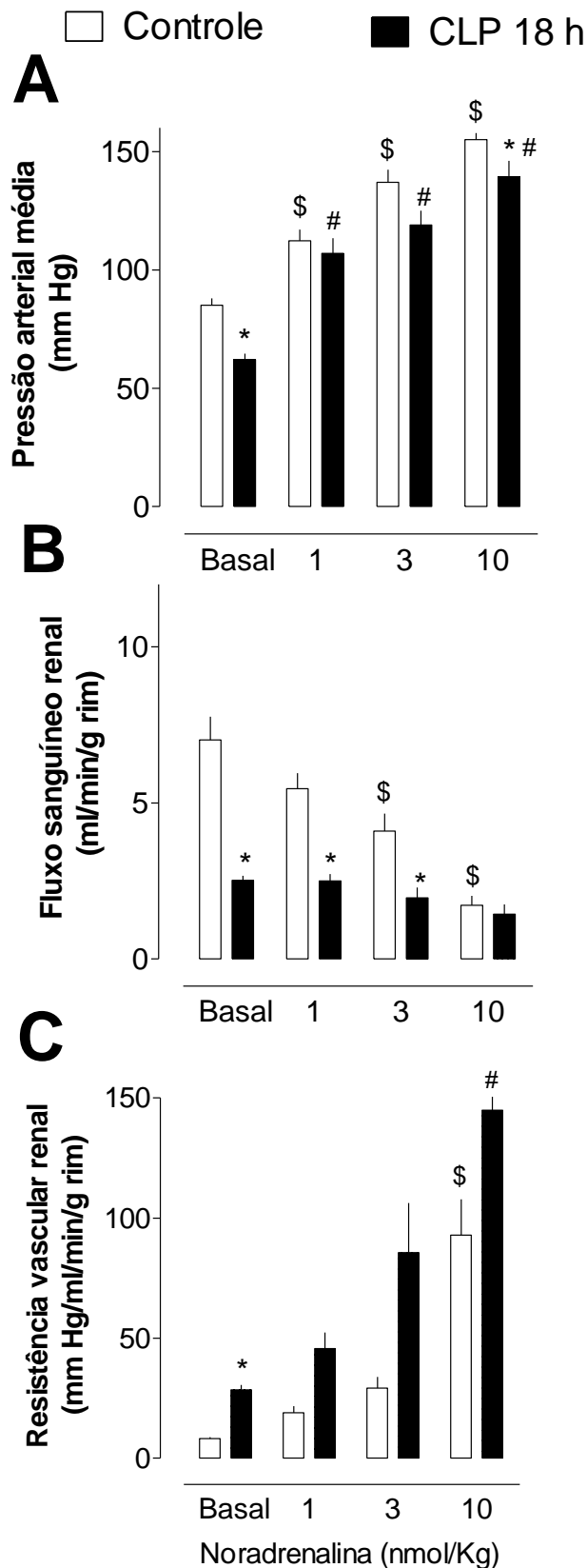


Figura 12. Efeitos da administração intravenosa de noradrenalina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h. Os gráficos demonstram os efeitos da noradrenalina na pressão arterial média (A), no fluxo sanguíneo renal (B), e na resistência vascular renal (C). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média, referentes a um $n = 4$ a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnett*. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. \$ $p < 0,05$ em relação aos valores basais do grupo controle. # $p < 0,05$ em relação aos valores basais grupo CLP 18 h.

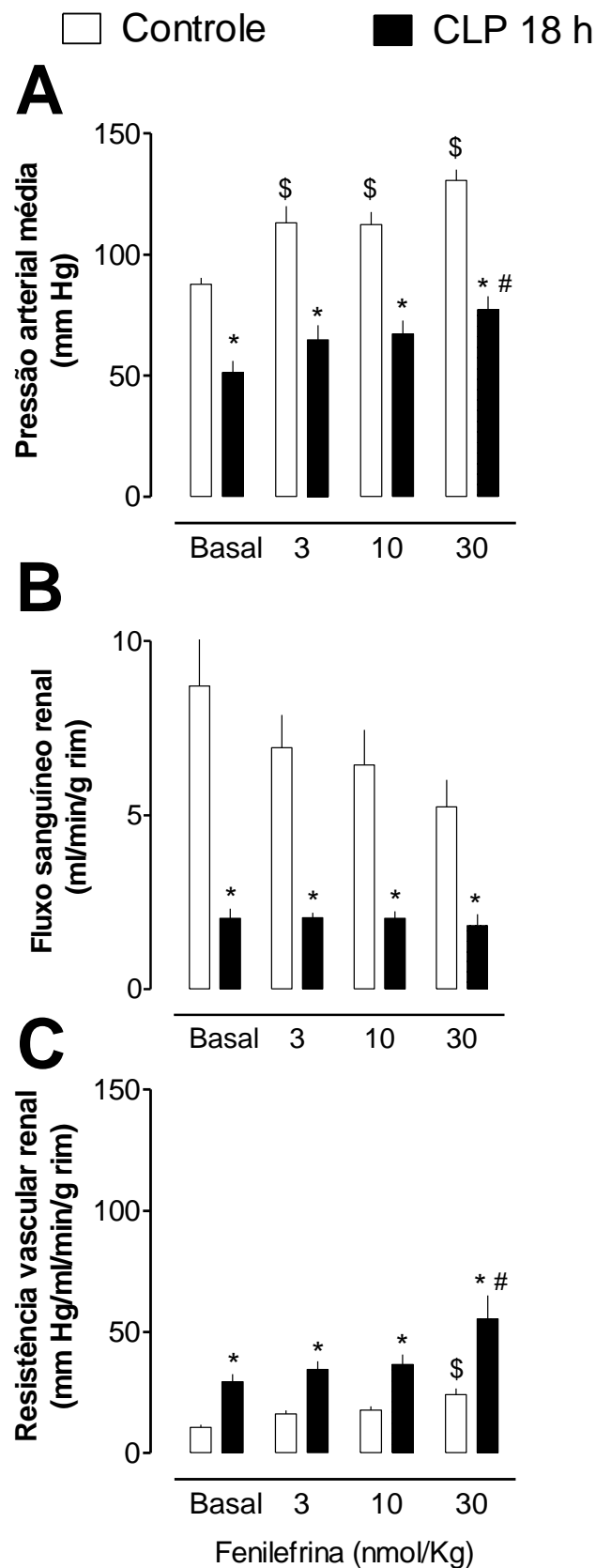


Figura 13. Efeitos da administração intravenosa de fenilefrina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h. Os gráficos demonstram os efeitos da fenilefrina na pressão arterial média (A), no fluxo sanguíneo renal (B), e na resistência vascular renal (C). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média, referentes a um $n = 4$ a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnnett* respectivamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. \$ $p < 0,05$ em relação aos valores basais do grupo controle. # $p < 0,05$ em relação aos valores basais grupo CLP 18 h.

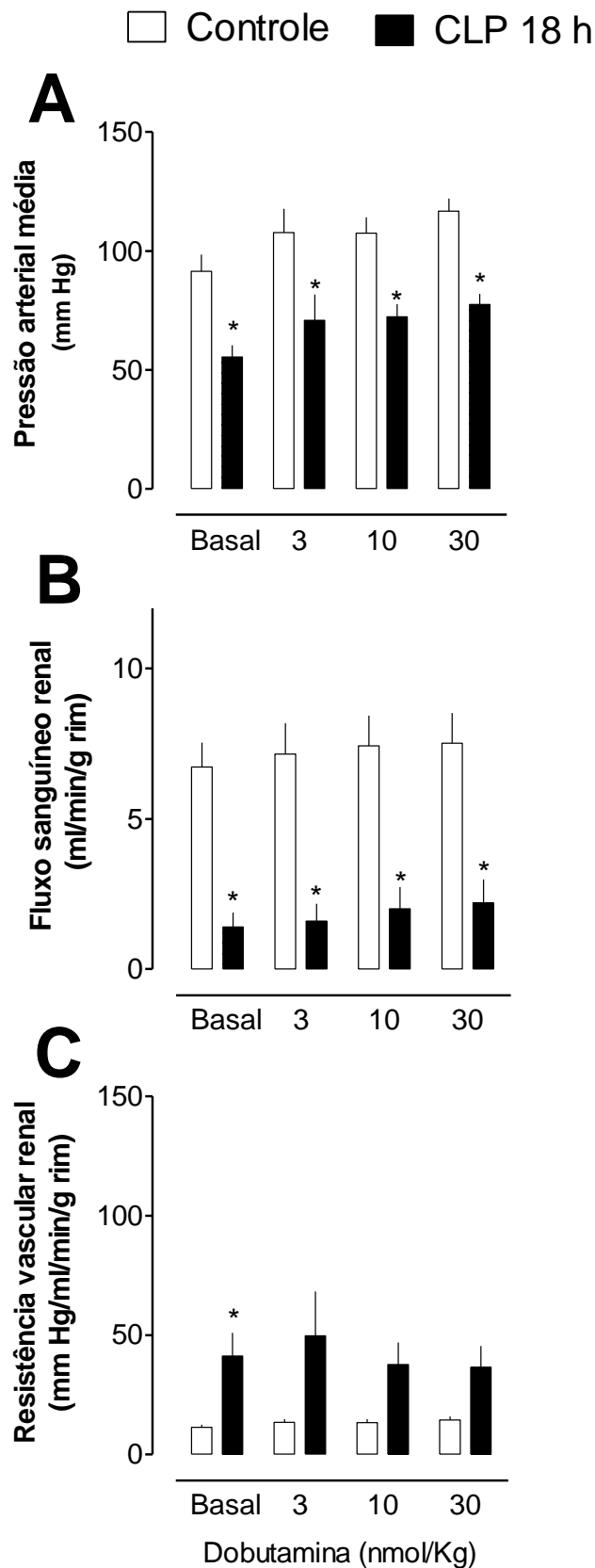


Figura 14. Efeitos da administração intravenosa de dobutamina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h. Os gráficos demonstram os efeitos da dobutamina na pressão arterial média (A), no fluxo sanguíneo renal (B), e na resistência vascular renal (C). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média, referentes a um $n = 4$ a 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Dunnett respectivamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Mesmo não sendo clinicamente utilizada na sepse, nós também avaliamos os efeitos da angiotensina II sobre a PAM e FSR_f nos animais com sepse. Nesse sentido, a administração de angiotensina II foi um outro agente vasopressor que teve seu efeito sobre a PAM (Figura 16A) e o FSR_f (Figura 16B) reduzido nos animais do grupo CLP 18 h, se comparado aos resultados obtidos no grupo controle. Além disso, o efeito da angiotensina II na PAM teve sua duração significativamente reduzida nos animais do grupo CLP 18 (Tabela 8), em comparação com os animais do grupo controle. Um ponto relevante a ser observado foi que a administração de angiotensina II resultou em uma significativa elevação da RVR tanto no grupo controle quanto no grupo CLP 18 h (Figura 16C). A administração de angiotensina II não modificou a FC em ambos os grupos estudados (Tabela 7).

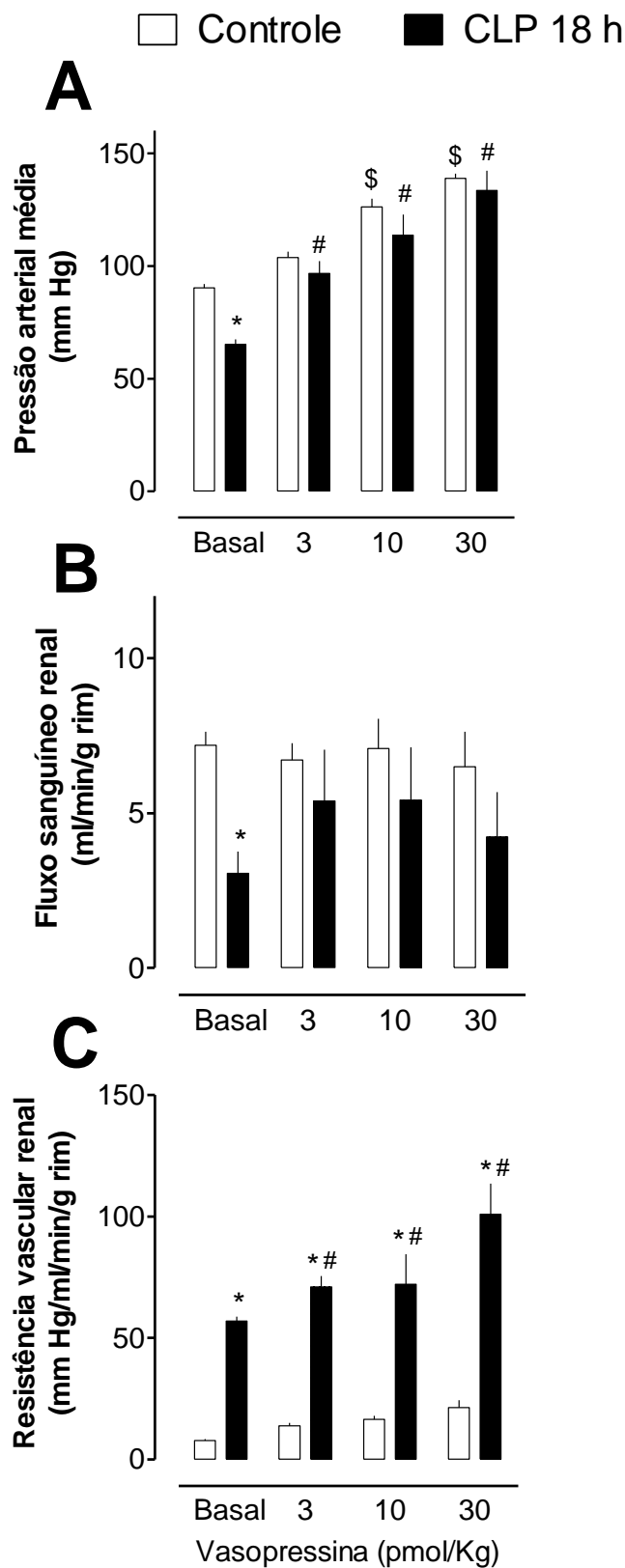


Figura 15. Efeitos da administração intravenosa de vasopressina sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h. Os gráficos demonstram os efeitos da vasopressina na pressão arterial média (A), no fluxo sanguíneo renal (B), e na resistência vascular renal (C). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média, referentes a um $n = 4$ a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnnett* respectivamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. \$ $p < 0,05$ em relação aos valores basais do grupo controle. # $p < 0,05$ em relação aos valores basais grupo CLP 18 h.

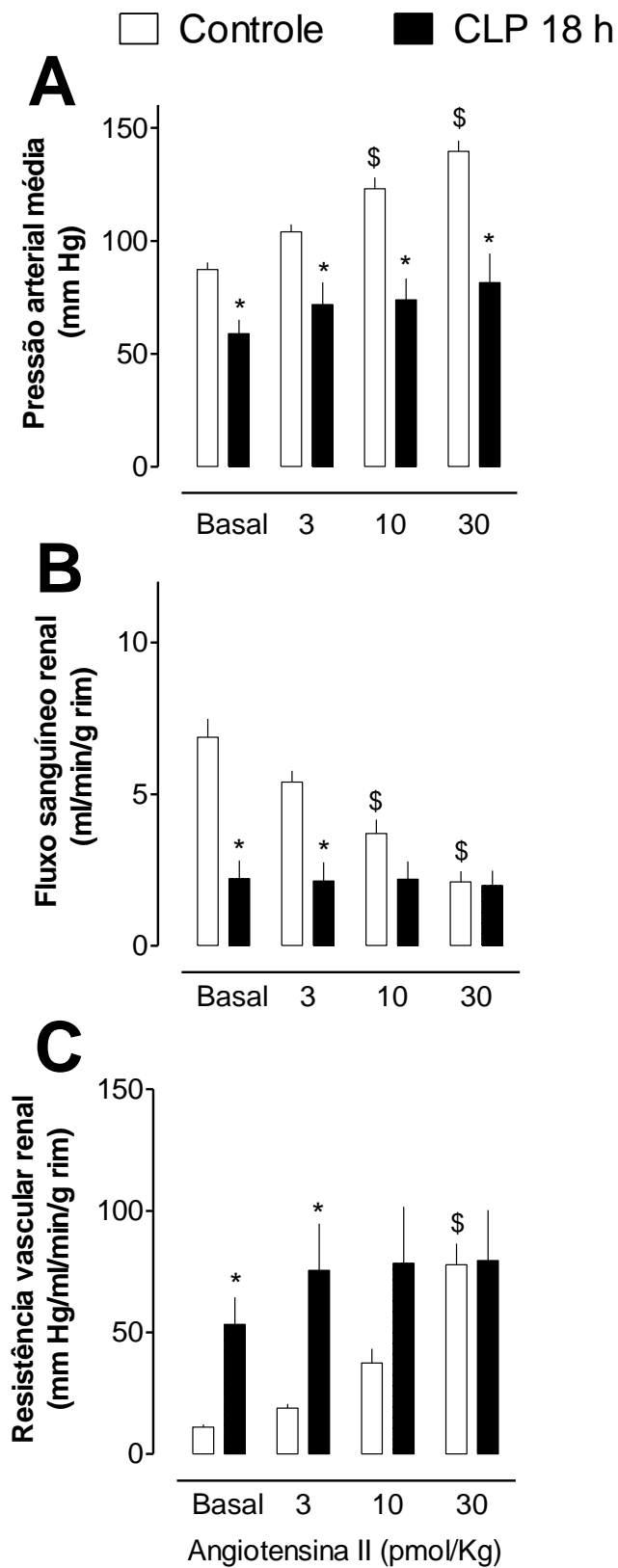


Figura 16. Efeitos da administração intravenosa de angiotensina II sobre a pressão arterial média, fluxo sanguíneo renal e resistência vascular renal em ratos dos grupos controle e CLP 18 h. Os gráficos demonstram os efeitos da angiotensina II na pressão arterial média (A), no fluxo sanguíneo renal (B), e na resistência vascular renal (C). Os resultados expressam média \pm erro padrão da média, referentes a um $n = 4$ a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnett* respectivamente. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. \$ $p < 0,05$ em relação aos valores basais do grupo controle. # $p < 0,05$ em relação aos valores basais grupo CLP 18 h.

Tabela 7. Efeitos dos agentes vasoconstritores e inotrópicos na frequência cardíaca em animais anestesiados

Droga	Dose	GRUPOS	
		Controle	CLP 18
Noradrenalina (nmol/Kg)	Basal	227,0 ± 16,4	276,2 ± 21,0
	1	218,1 ± 18,6	267,2 ± 25,4*
	3	202,0 ± 17,0	272,0 ± 25,4*
	10	194,9 ± 14,9	261,6 ± 29,4*
Fenilefrina (nmol/Kg)	Basal	234,0 ± 21,0	271,0 ± 28,1
	3	218,0 ± 21,0	284,3 ± 27,8
	10	220,9 ± 23,3	274,5 ± 35,1
	30	218,9 ± 28,4	280,8 ± 35,0
Dobutamina (nmol/Kg)	Basal	207,0 ± 10,8	291,8 ± 28,0
	3	227,0 ± 9,8	305,2 ± 29,6
	10	258,3 ± 16,9	340,2 ± 21,0
	30	270,8 ± 15,5	367,3 ± 23,3 *
Vasopressina (pmol/Kg)	Basal	255,0 ± 28,6	234,0 ± 23,6
	3	244,5 ± 29,9	230,4 ± 21,9
	10	225,8 ± 24,0	223,2 ± 26,2
	30	200,7 ± 15,0	207,2 ± 22,6
Angiotensina II (pmol/Kg)	Basal	273,0 ± 12,5	290,8 ± 15,6
	3	248,0 ± 13,9	283,8 ± 10,4
	10	237,0 ± 11,7	282,8 ± 10,4
	30	238,0 ± 16,6	291,0 ± 15,3*

Os valores foram expressos em médias da frequência cardíaca (em bpm) ± erro padrão da média. n = 4 a 7 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnnett* respectivamente. * p< 0,05 em relação ao grupo controle

Tabela 8. Duração do efeito de drogas vasoconstritoras e inotrópicos na pressão arterial média (PAM) e no fluxo sanguíneo renal (FSR_f) em animais anestesiados.

Agente Vasoconstritor	Dose	Duração do efeito (s) - PAM		Duração do efeito (s) - FSR _f	
		Controle	CLP 18 h	Controle	CLP 18 h
Noradrenalina (nmol/Kg)	1	287,3 ± 28,6	162,2 ± 15,7*	146,3 ± 14,6	79,2 ± 20,1
	3	258,6 ± 29,8	170,9 ± 17,9*	174,4 ± 20,1	110,6 ± 16,6
	10	324,9 ± 23,2	228,2 ± 32,1*	224,2 ± 43,9	147,6 ± 27,9
Fenilefrina (nmol/Kg)	3	252,6 ± 36,0	163,3 ± 16,6	147,6 ± 47,7	88,9 ± 17,4
	10	304,0 ± 31,7	124,7 ± 22,4*	195,2 ± 32,1	74,6 ± 7,4
	30	355,6 ± 27,0	156,7 ± 21,9*	239,1 ± 44,5	129,3 ± 22,7
Dobutamina (nmol/Kg)	3	246,7 ± 41,4	134,3 ± 22,8	153 ± 39,7	108,8 ± 17,07
	10	266,9 ± 23,8	165,0 ± 29,8	207,1 ± 29,7	156,0 ± 29,0
	30	298,4 ± 19,9	191,3 ± 33,4	217,0 ± 36,2	227,6 ± 50,5
Vasopressina (pmol/Kg)	3	303,5 ± 53,8	245,0 ± 63,3	119,7 ± 15,9	108,5 ± 25,4
	10	594,4 ± 72,0	366,0 ± 114,6	418,9 ± 64,8	214,5 ± 54,8
	30	716,1 ± 111,6	627,0 ± 142,8	541,8 ± 140,2	340,8 ± 77,4
Angiotensina II (pmol/Kg)	3	178,3 ± 13,6	124,3 ± 12,6*	147,3 ± 19,8	67,7 ± 25,2
	10	250,1 ± 18,9	125,5 ± 18,4*	222,8 ± 18,2	93,2 ± 18,6*
	30	304,2 ± 25,2	132,8 ± 23,2*	266,6 ± 22,3	122,8 ± 22,8*

Os resultados expressam média ± erro padrão da média, referentes a um n= 4 a 6 animais por grupo. Análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de *Dunnett* respectivamente. * p< 0,05 em relação ao grupo controle.

5.3 PARTE III: EFEITO DOS MODULADORES DE CANAIS DE POTÁSSIO NA REATIVIDADE VASCULAR RENAL E FSR

5.3.1 Efeito da inibição de canais de potássio, com TEA ou GLB, no aumento da PPR induzida por vasoconstritores em modelo de rim isolado *in vitro*

Para avaliar a participação dos canais de K^+ nas alterações da reatividade vascular renal *in vitro* nos animais com sepse, foram utilizados o TEA (um bloqueador não seletivo de canal de K^+), e a GLB (um inibidor seletivo dos canais K_{ir} 6.1-6.2).

Com o objetivo de verificar se a PPR basal foi alterada pelos bloqueadores de canais de K^+ , nós analisamos os valores da PPR antes e após a infusão do TEA ou GLB, conforme valores demonstrados na tabela 9. A PPR basal dos rins obtidos dos animais controles depois do período de estabilização (aproximadamente 40 minutos) e antes da administração de qualquer agente vasoconstritor foi de $45,1 \pm 1,7$ mm Hg, na qual, não foi alterada pela perfusão dos bloqueadores de canais de potássio (TEA ou GLB) (Tabela 9). Os valores da PPR basal dos animais do grupo CLP 18 h foram mais elevados em comparação com os animais do grupo controle (Tabela 9). Embora a perfusão com TEA não tenha alterado a PPR dos rins de animais do grupo CLP 18 h, por outro lado, a adição de GLB reduziu os valores da PPR do grupo CLP 18 h para valores semelhantes aos obtidos nos animais do grupo controle (Tabela 9).

A perfusão com TEA ou GLB no leito vascular renal não induziu nenhuma mudança na resposta da noradrenalina e da fenilefrina na PPR de preparações de rim isolado dos animais do grupo controle (Figura 17). Entretanto, a perfusão com TEA restaurou a hiporreatividade para fenilefrina observada nos rins dos animais com sepse (CLP 18 h) (Figura 17C). No grupo CLP 18 h a hiporreatividade do leito vascular renal para a noradrenalina não foi revertida pela perfusão com o TEA (Figura 17A).

A perfusão da GLB nos rins dos animais do grupo CLP 18 h não foi capaz de reverter a hiporreatividade do leito vascular renal tanto para noradrenalina quanto

para a fenilefrina (Figura 17B e D, respectivamente). Por outro lado, a hiporreatividade renal para a noradrenalina foi acentuada pela perfusão de GLB nos animais com sepse, conforme pode ser visualizado na Figura 17B.

Tabela 9. Efeitos da sepse induzida por CLP e do bloqueio dos canais de potássio na pressão de perfusão renal (PPR) basal *in vitro*.

Grupos	Controle	CLP 18 h
Valores basais	45,1 ± 1,7	59,5 ± 4,4 *
+ Tetraetilamônio (1 mM)	46,3 ± 3,8	60,8 ± 2,5
+ Glibenclamida (40 µM)	40,7 ± 1,6	45,0 ± 4,4 #

Os valores representam a média da PPR (em mm Hg), de 5 a 8 animais (média ± erro padrão da média). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet. * P < 0,05 em comparação com o a PPR medida nos animais do grupo controle nas mesmas condições experimentais. # P < 0,05 quando comparada com a PPR do mesmo grupo sem a administração de bloqueadores de canais de K⁺.

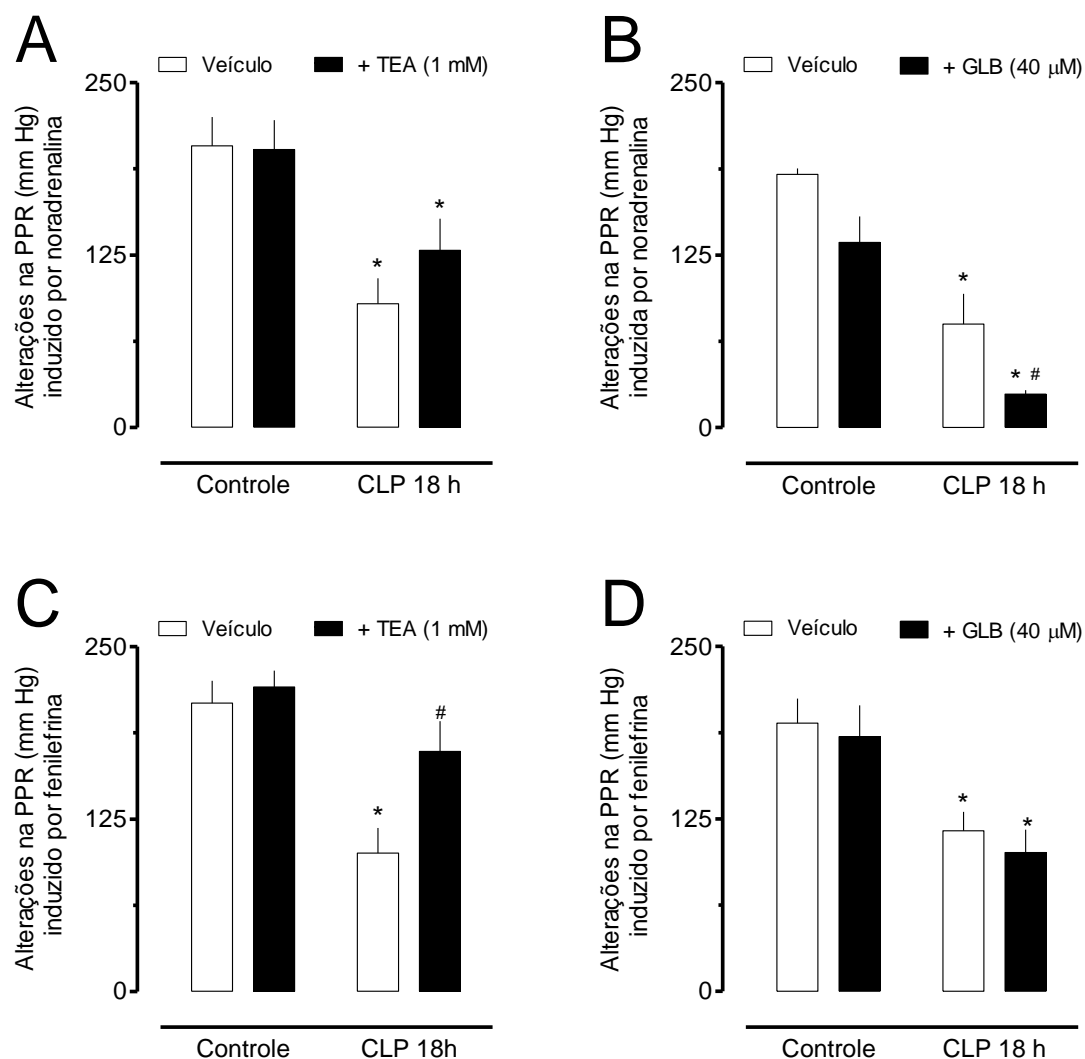


Figura 17. Influência dos bloqueadores de canais de K^+ , TEA e GLB, na hiporreatividade vascular renal para vasoconstritores em animais com sepse. As mudanças na pressão de perfusão renal (PPR) em resposta para noradrenalina (10 nmol, A e B) e fenilefrina (30 nmol, C e D), foram avaliadas de rins obtidos de animais do grupo Controle e CLP 18 h, antes (barras abertas-veículo) e após (Barras fechadas) a perfusão com tetraetilamônio (TEA 1mM, A e C) ou glibenclamida (GLB 40 μM, B e D). Os gráficos expressam a média da PPR (em mm Hg) \pm erro padrão da média, referentes a um n= 4 a 8 animais. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ quando comparadas com as respostas antes da administração dos bloqueadores de canais de K^+ no mesmo grupo.

5.3.2 Efeito dos moduladores de canais de K⁺ sobre a pressão arterial média e fluxo sanguíneo renal por laser doppler (FSR_{LD}) em animais com sepse anestesiados

Assim como observado nos experimentos anteriores, os animais do grupo CLP 18 h apresentaram hipotensão e redução do FSR_{LD} (Figura 18A e D respectivamente) em comparação com os animais do grupo controle.

A administração intravenosa dos bloqueadores de canais de K⁺ (TEA, GLB e IBTX), não causou nenhuma mudança nos níveis de PAM dos animais controle (Figura 18A, barras abertas). Da mesma forma, a administração de IBTX também não causou nenhum efeito sobre os níveis de pressão arterial dos animais do grupo CLP 18 h (Figura 18A). Por outro lado, o TEA e a GLB aumentaram a PAM nos animais do grupo CLP 18 h, para níveis semelhantes aos observados nos animais do grupo controle (Figura 18A, barras fechadas). A Figura 18D mostra que a administração de bloqueadores de canais de K⁺ (TEA, GLB e IBTX) não modificou os valores basais do FSR_{LD} tanto no grupo controle quanto no grupo CLP 18 h.

O registro simultâneo da influência dos bloqueadores de canais de K⁺ na PAM e FSR durante a administração intravenosa de noradrenalina e fenilefrina revelou que ambos TEA e GLB, foram capazes de aumentar o efeito pressórico desses agentes nos animais do grupo CLP 18 h (Figura 18B e C, barras fechadas), sem afetar seus efeitos nos animais do grupo controle (Figura 18B e C, barras abertas).

Nas figuras 18D, 18E e 18F (barras abertas), é possível observar que a administração de noradrenalina ou fenilefrina (antes da administração dos bloqueadores de canais de potássio), foi capaz de reduzir o FSR_{LD} em aproximadamente 30-50% nos animais do grupo controle, mas não prejudicou o reduzido FSR_{LD} dos animais com sepse. Todavia, a redução do FSR_{LD} induzida pela noradrenalina e pela fenilefrina nos animais do grupo controle não foi influenciada pelos bloqueadores de canais de K⁺ (TEA, GLB e IBTX) (Figura 18E e F, barras abertas). A administração de TEA também não foi capaz de alterar os efeitos da noradrenalina e da fenilefrina sobre o FSR_{LD} dos animais do grupo CLP 18 h (Figura

18E e F, barras fechadas). Por outro lado, nos animais do grupo CLP 18 h, a administração da GLB e IBTX, acentuou a redução do FSR_{LD} em resposta à noradrenalina e fenilefrina (Figura 18E e F, barras fechadas).

Com o objetivo de investigar se os efeitos dos bloqueadores de canais de K^+ estavam restritos a catecolaminas, nós também avaliamos os efeitos, no FSR_{LD} e PAM, da administração da angiotensina II antes e após a administração do GLB e IBTX (Figura 20). Assim como observado anteriormente (Figura 20), os animais do grupo CLP 18 h também demonstraram hiporreatividade para a angiotensina II. A administração de GLB ou IBTX não alterou a resposta pressórica da angiotensina II nesses animais, e tampouco nos animais do grupo controle (Figura 20B). A administração de GLB causou uma redução adicional do FSR_{LD} após a administração de angiotensina II nos animais do grupo CLP 18 h (Figura 20 D barras fechadas), efeito esse não observado nos animais do grupo controle (Figura 20D barras abertas). Esses efeitos também não foram observados com a administração da IBTX em ambos os grupos (Figura 20D, barras fechadas).

O próximo passo foi investigar se os abridores de canais de potássio (NS1619 e minoxidil) seriam capazes de reverter as alterações encontradas na reatividade dos animais com sepse, assim como se antagonizariam os efeitos dos bloqueadores de canais K^+ nesses animais (Figura 19).

A administração de um abridor seletivo do canal $K_{Ca1.1}$, o NS 1619, pelo menos na dosagem utilizada no presente estudo, não causou nenhuma mudança direta na pressão arterial e FSR_{LD} dos animais do grupo Controle e CLP 18 h, assim como não modificou os efeitos da fenilefrina e noradrenalina (Figura 19). Por outro lado, a administração de minoxidil não alterou o FSR_{LD} do grupo controle e CLP 18 h (Figura 19D). Entretanto, a administração desse abridor de canais de potássio Kir 6.1 causou uma redução da PAM nos animais do grupo CLP 18 h, assim como uma redução dos efeitos hipertensivos da fenilefrina e noradrenalina em ambos os grupos CLP 18 h e controle (Figura 19A, B e C respectivamente). Um achado interessante é que a administração de minoxidil não modificou os efeitos dos agentes vasoativos no FSR_{LD} dos animais com sepse, mas preveniu parcialmente a redução do FSR_{LD} em resposta à noradrenalina (e não para a fenilefrina) nos animais do grupo controle (Figura 19F, barras abertas).

A tabela 10 mostra os valores de FC antes e após a administração dos agentes vasoconstritores (fenilefrina e noradrenalina) e, em associação com os bloqueadores (TEA, GLB e IBTX) e abridores (NS1619 e minoxidil) dos canais de K⁺. Somente o IBTX diminuiu significativamente a FC dos animais do grupo controle, incluindo o efeito após a administração de noradrenalina (Tabela 10). Curiosamente, apesar da falta de efeitos do TEA na FC basal, nos animais de ambos os grupos controle e CLP 18 h, foi observado um aumento do cronotropismo em resposta a noradrenalina após a administração desse inibidor do canal de K⁺ (Tabela 10). Por outro lado, os animais do grupo CLP 18 h, após a administração de GLB, apresentaram redução significativa dos valores de FC após a administração da fenilefrina e da noradrenalina, em comparação com os valores obtidos dos animais do grupo controle (Tabela 10). Efeitos opostos foram observados no grupo CLP 18 h após a administração de minoxidil, onde foi observado um aumento significativo da FC após a administração de noradrenalina (Tabela 10).

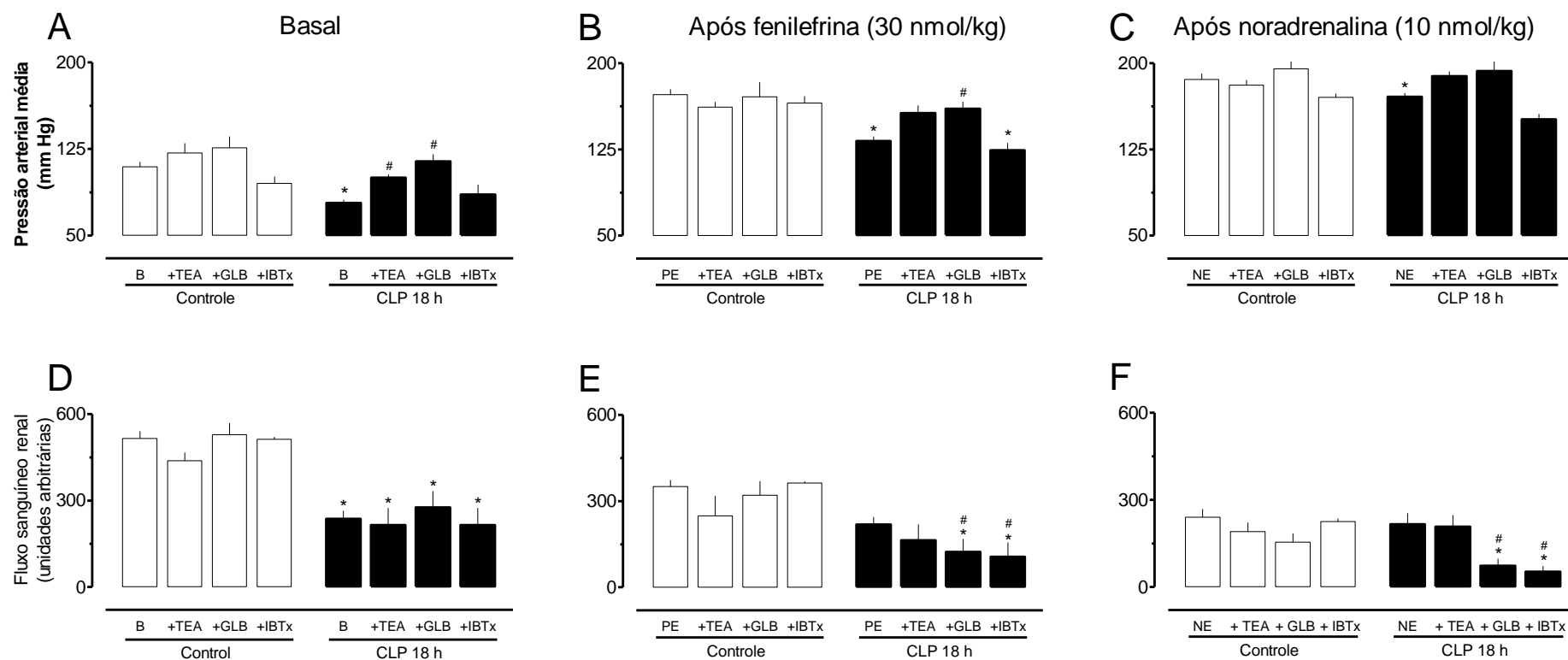


Figura 18. Efeito dos bloqueadores de canais de K⁺ (TEA, GLB e IBTX) na resposta do fluxo sanguíneo renal (Doppler) e pressão arterial média para fenilefrina e noradrenalina em animais anestesiados. Os gráficos mostram em os valores basais do FSR e o efeito da FE (A), os valores basais e o efeito da NORA (B), os valores basais com a adição do TEA e o efeito de FE (C) e NORA (D), os valores basais com a adição de GLB e o efeito da FE (E) e NORA (F) e o valores basais com a adição de IBTX e o efeito da FE (G) e NORA (H). Os valores expressam média \pm erro padrão da média para um n de 4 a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnet. * P < 0,05 em comparação com o valores basais do grupo controle. # P < 0,05 em comparação com valores basais de grupo CLP 18 h. & P < 0,05 em comparação com os valores basais do grupo controle.

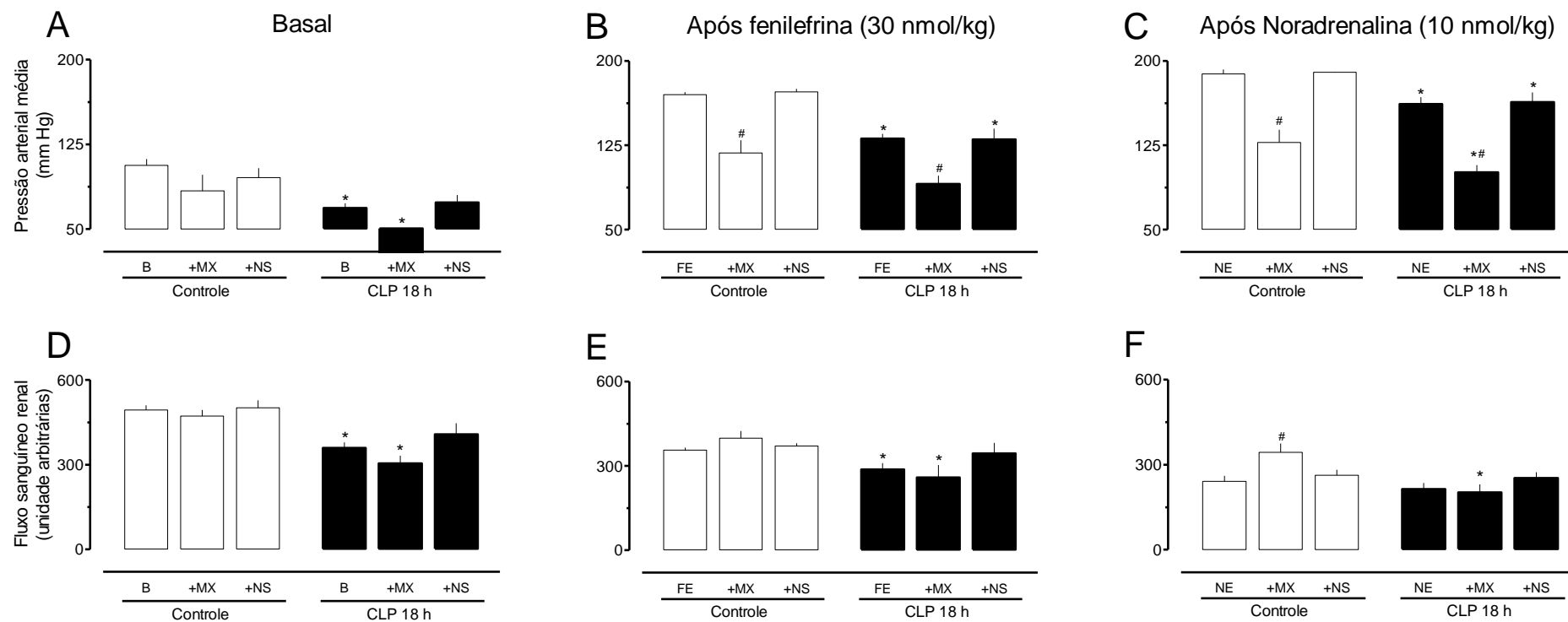


Figura 19. Efeito dos ativadores de canais de K^+ na resposta do fluxo sanguíneo renal (Doppler) e pressão arterial média para fenilefrina e noradrenalina em animais anestesiados. Os animais do grupo controle (barra aberta) e grupo CLP 18 h (barra fechada) foram anestesiados e realizado o registro simultâneo da pressão arterial média (A, B e C), e do fluxo sanguíneo renal (C, D e E), sendo analisado os valores basais (A e C) e após a administração de fenilefrina (FE; B e E) ou noradrenalina (NE; C e F) antes e depois a administração de minoxidil (MX; 10 μ mol/Kg), ou NS 1619 (NS; 30 nmol/Kg). Os valores expressam média \pm erro padrão da média para um n de 4 a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. * $P < 0,05$ em comparação com o valores basais do grupo controle; # $P < 0,05$ em comparação com valores obtidos sem a administração dos abridores de canais de K^+ no mesmo grupo experimental.

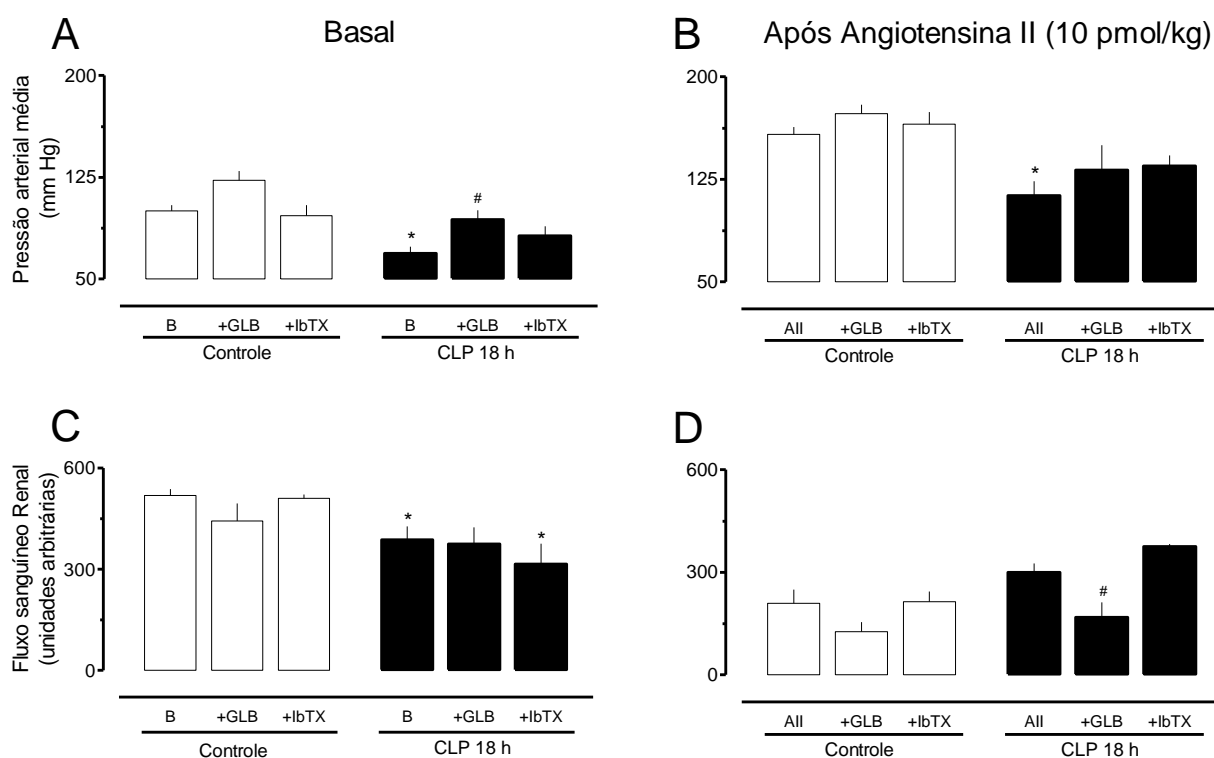


Figura 20. Efeitos na sepse dos bloqueadores de canais de K⁺ e da angiotensina II na pressão arterial e fluxo sanguíneo renal por laser doppler em ratos. Os animais do grupo controle (barra aberta) e grupo CLP 18 h (barra fechada) foram anestesiados e realizado o registro simultâneo da pressão arterial média (A e B), e do fluxo sanguíneo renal (C e D), sendo analisado os valores basais (A e C) e após a administração de angiotensina II (B e D), antes e depois a administração de glibenclâmida (GLB; 40 µmol/Kg), ou iberitoxina (IBTX; 0,3 nmol/Kg/min durante 5 min). Os valores expressam média ± erro padrão da média para um n de 4 a 6 animais. A análise estatística foi realizada pela ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey. * P < 0,05 em comparação com o valores basais do grupo controle; # P < 0,05 em comparação com valores obtidos sem a administração dos bloqueadores de canais de K⁺ no mesmo grupo experimental.

Tabela 10. Efeito dos bloqueadores e de ativadores de canais de K⁺ na frequência cardíaca (FC) de animais controles e com sepse anestesiados.

	basal		depois de FE (30 nmol/kg, i.v.)		Depois de NE (10 nmol/kg, i.v.)	
	Control	CLP 18 h	Control	CLP 18 h	Control	CLP 18 h
Veículo	287 ± 13	238 ± 15	276 ± 9	245 ± 20	342 ± 17	257 ± 28
Tetraetilamônio (360 µmol/kg, i.v.)	312 ± 29	315 ± 16	297 ± 30	310 ± 37	471 ± 4 ^{*, α}	388 ± 45 [*]
Glibenclamida (40 µmol/kg, i.v.)	280 ± 17	236 ± 10	339 ± 34	188 ± 25 [#]	354 ± 29	186 ± 34 [#]
Iberiotoxina (0.3 nmol/kg/min, i.v.)	192 ± 31 [*]	244 ± 60	225 ± 61	206 ± 14	213 ± 59 [*]	153 ± 12 [*]
Minoxidil (10 µmol/Kg, iv.)	282 ± 13	332 ± 6	294 ± 20	306 ± 15	396 ± 26 ^α	413 ± 12 ^{*, α}
NS 1619 (30 nmol/Kg, i.v.)	300 ± 8	297 ± 6	291 ± 12	264 ± 20	355 ± 15	312 ± 28

Os valores representam a média da FC (em bpm), de 5 a 8 animais (média ± erro padrão da média). * p < 0,05 em comparação com os valores de FC do mesmo grupo tratados com veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Dunnett). # p < 0,05 em comparação com valores de FC obtidas dos animais do grupo controle submetidos aos mesmos agentes vasoconstritores e moduladores dos canais de K⁺ (ANOVA de duas vias seguida de teste de TUKEY); α p < 0,05 em comparação com os valores de FC mensurada em animais do mesmo grupo após a administração dos inibidores de canais de K⁺ na ausência de agentes vasoativos (ANOVA de duas vias seguida de teste de TUKEY).

6. DISCUSSÃO

Apesar de ser uma condição historicamente conhecida, a sepse severa e o choque séptico ainda estão associados com altas taxas de mortalidade. Desta forma, representam um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo. As altas taxas de mortalidade refletem a complexidade dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos, das complicações em órgãos alvos e consequentemente do insucesso da terapêutica utilizada para reversão do estado de sepse severa e choque séptico. Atualmente, muitas pesquisas buscam alternativas para reduzir as complicações decorrentes da sepse e, assim, contribuir para a redução da mortalidade. No entanto, um mecanismo certo, associado com uma estratégia clara para reverter essas situações, ainda não foi encontrado.

Na busca por avanços na terapêutica da sepse, milhares de estudos experimentais têm sido realizados. Embora a correlação entre estudos experimentais e clínicos representem um grande desafio por parte dos pesquisadores, muitos trabalhos têm encontrado correlações positivas nos estudos com sepse. Nesse sentido, os modelos experimentais na sepse configuram uma ferramenta de extrema importância para a investigação de parâmetros que comumente não são viáveis na clínica com humanos.

De um modo geral, os modelos experimentais na sepse se diferenciam principalmente em relação à espécie utilizada, ao procedimento de indução da sepse, reposição de fluidos e terapêutica coadjuvante. Segundo DOI *et al.* (2009), os principais modelos experimentais, levando em consideração o procedimento de indução da sepse, são por: (1) injeção de uma endotoxina como, por exemplo, o LPS; (2) infusão ou instilação de uma bactéria exógena; e; (3) alteração da barreira de proteção interna dos animais como, por exemplo, a perfuração do ceco no modelo de CLP. A administração de uma endotoxina é comumente usada como um modelo de sepse, e caracteriza-se por ser um componente da membrana de bactérias Gram-negativas que estão associadas diretamente com a fisiopatologia da sepse (DOI *et al.*, 2009; REMICK & WARD, 2005). Desta forma, o LPS estimula a liberação de vários tipos de mediadores inflamatórios de diferentes tipos celulares. Em geral, as doses de LPS utilizadas em animais resultam em hipotermia e outros

sinais clássicos da disfunção cardiovascular encontrada na sepse (NEMZEK *et al.*, 2008). A infusão ou instilação de bactérias exógenas também é um modelo amplamente utilizado como sepse experimental. Diferentes espécies de bactérias aeróbicas têm sido utilizadas na indução da sepse e choque séptico. No entanto, a *Escherichia coli* é uma das mais utilizadas (POLI-DE-FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Uma das vantagens deste método é a padronização da cepa de bactéria utilizada e da dose. No entanto, existem algumas críticas relacionadas a esse modelo pelo fato de não reproduzir muitas características importantes da sepse em humanos (NEMZEK *et al.*, 2008).

O modelo de indução de sepse por CLP adotado no presente estudo é um dos modelos de sepse mais comumente utilizados, sendo considerado um “padrão ouro” na sepse experimental (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Caracteriza-se pela gênese da sepse a partir de um foco infeccioso polimicrobiano com translocação das bactérias para o compartimento sanguíneo (RITTIRSCH *et al.*, 2009; MAIER *et al.*, 2004; MENEZES *et al.*, 2008), configurando um modelo de peritonite. É amplamente utilizado e é considerado um modelo realístico de sepse, por apresentar alterações cardiovasculares similares às observadas em humanos (NEMZEK *et al.*, 2008).

Um ponto importante a ser considerado no modelo de sepse por CLP é o tempo após a indução da sepse que caracterize a presença de manifestações importantes. O estudo da reatividade vascular renal, além de ser foco de nosso estudo, demonstrou ser um importante parâmetro para a escolha do tempo após a sepse para o presente estudo no modelo de sepse por CLP. Nesse sentido, em avaliações *in vitro* usando o rim de ratos submetidos à sepse, nós confirmamos que o leito vascular renal apresenta redução da reatividade para a noradrenalina (nos tempos 6, 18 e 36 h) e para a fenilefrina (nos tempos 18 e 36 h) após a indução da sepse. Esses achados estão de acordo com estudos que demonstram a redução da responsividade para agonistas do receptor α -1 adrenérgico em modelos experimentais de sepse, incluindo o leito vascular renal (CHEN *et al.*, 1994; GUARIDO *et al.*, 2014). A partir desses experimentos e frente a outros resultados, como a curva de sobrevivência, foi determinado o tempo de 18 h após a indução da sepse para a realização das próximas etapas do presente estudo.

O modelo experimental de sepse, induzido por CLP, mimetiza características clássicas da sepse humana, como hipotensão, redução da reatividade cardiovascular para vasoconstritores e disfunção em órgãos (DELLINGER *et al.*, 2013). Neste contexto, nossos resultados demonstraram que 18 h após a indução da sepse por CLP, além dos animais demonstrarem características que configuram a presença de sepse, como elevados níveis de nitrato/nitrito sérico e leucopenia, foi possível também observar a presença de manifestações do agravamento da sepse, com achados que configuram uma sepse severa ou um quadro de choque séptico, como alta mortalidade, significativa hipotensão, redução da reatividade cardiovascular e renal para agentes vasoconstritores e, ainda, alterações funcionais renais importantes que caracterizam a presença de disfunção em um órgão.

A disfunção de um ou mais órgãos sinaliza o agravamento da sepse e está diretamente relacionada com a elevação das taxas de mortalidade. O sistema renal, além de configurar um dos focos de estudo do presente trabalho, é um dos sistemas mais comumente acometidos pela sepse. Em geral, o sistema renal é conhecido pela sua complexidade e por desempenhar diferentes funções indispensáveis para a sobrevivência humana. Neste contexto, a redução do processo de filtração glomerular é uma das principais características da IRA na sepse, e clinicamente pode ser expressa pela elevação dos níveis de creatinina e redução do débito urinário (DELLINGER *et al.*, 2013; REGUEIRA *et al.*, 2011; PLATAKI *et al.*, 2011). Desta forma, podemos correlacionar esses achados clínicos com os experimentais do presente estudo e afirmar a redução do processo de filtração glomerular nos animais 18 h após a indução da sepse. Tanto a disfunção renal quanto a sepse podem ser responsáveis por alterações nos níveis de eletrólitos no organismo, sendo os desequilíbrios mais comuns a hiponatremia e hipercalemia (PADHI *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2012). De um modo geral, esses achados corroboram com os resultados do presente estudo, onde evidenciamos essas alterações nos animais 18 h após a indução da sepse.

A sepse atua em multifatores para o surgimento da IRA, justificando desta forma ser uma das complicações mais comuns (BOFFA & ARENDSHORST, 2005) e mais graves do choque séptico (WANG *et al.*, 2012). De acordo com Sharfuddin *et al.*, (2013), dentro desses multifatores, podemos destacar o envolvimento de causas tanto renais intrínsecas (como lesões diretas no tecido renal), assim como causas

pré-renais (como, por exemplo, a redução da perfusão tecidual). Desse modo, a produção excessiva de mediadores inflamatórios na sepse contribui significativamente para a participação em fatores intrínsecos da IRA, levando a lesões diretas no parênquima renal. Em nosso estudo não realizamos análises estruturais e histológicas do tecido renal, mas, estudos experimentais com o modelo de CLP demonstram a infiltração de macrófagos e monócitos no tecido renal em animais com sepse 24 h após a indução por CLP (RODRIGUES *et al.*, 2012). Uma estimativa de dano da barreira de filtração glomerular comumente utilizada na clínica é a proteinúria. Em contraste, nossos resultados, mostraram que os valores de proteinúria foram reduzidos nos animais do grupo CLP 18 h. No entanto, a dosagem de proteínas na urina pode não representar o início da IRA na sepse. Um estudo interessante realizado por Adembri *et al.*, (2011) mostrou que em ratos, 7 h após a indução da sepse por CLP, havia maior permeabilidade da barreira de filtração glomerular para albumina, caracterizada pela perda de componentes importantes da membrana, como o glicocálix.

Os fatores hemodinâmicos são fortes modificadores do processo de filtração glomerular. Cabe ressaltar, que além dos fatores intrínsecos da IRA na sepse, os fatores pré-renais, como por exemplo a hipotensão, também desempenham função importante na sua gênese. Em algumas condições como nos quadros de choque hemorrágico, as causas pré-renais são determinantes para o aparecimento das lesões renais (BASILE *et al.*, 2012; SORDI, *et al.*, 2015). Nesses casos, a redução do FSR e da filtração glomerular se associam principalmente à ativação do SNS e liberação excessiva de angiotensina II. Desta forma, podemos sugerir uma possível participação dos fatores hemodinâmicos nas alterações renais observadas nos animais do grupo CLP 18, visto que em casos de sepse com estados hiperdinâmicos, a diminuição do FSR é menos frequente (LANGENBERG, *et al.*, 2005). Outro ponto importante é a relação da disfunção cardíaca e a presença das alterações da função renal. Alguns estudos demonstram a associação entre a redução do débito cardíaco e a diminuição do FSR (LANGENBERG, *et al.*, 2005). Em nosso estudo não avaliamos o débito cardíaco dos animais com sepse, e é importante ressaltar a necessidade de mais estudos para confirmar essa possível correlação.

Embora os dados referentes às causas da IRA na sepse ainda não sejam completamente conhecidos, o desequilíbrio hemodinâmico e a vasodilatação sistêmica na sepse têm sido propostos como um dos mecanismos ligados à isquemia ou hipoperfusão acompanhadas de diminuição do fluxo sanguíneo renal (FSR) e vasoconstrição renal (REGUEIRA *et al.*, 2011). Nossos resultados permitiram confirmar a presença de modificações hemodinâmicas renais nos animais com sepse, caracterizadas pela redução do FSR e aumento da RVR nos animais do grupo CLP 18. Em condições fisiológicas, o aumento da pressão na artéria renal é acompanhado pela redução do diâmetro das arteríolas aferentes (LOUTZENHISER *et al.*, 2006), fenômeno esse bem definido pelo processo de autorregulação renal. Frente à expressiva hipotensão nos animais com sepse, o leito vascular renal responde de maneira diferente na sepse. As razões do intrigante contraste da vasoconstrição renal *versus* hipotensão sistêmica na sepse ainda são pouco compreendidos. Uma das hipóteses seria a queda da pressão abaixo da pressão autorregulatória renal, resultando em prejuízo do refinado controle na circulação renal. Por outro lado, alguns estudos demonstram que o mecanismo de autorregulação renal não é prejudicado pela sepse (BURBAN *et al.*, 2013). A restauração dos valores de pressão arterial em nosso estudo não foi acompanhada de modificações no FSR dos animais com sepse. Adicionalmente, nós observamos que nos animais com sepse após 18 h da indução por CLP, a redução do FSR *in vivo*, foi acompanhada de uma elevação dos níveis basais de pressão de perfusão renal (PPR) no modelo de rim isolado *in vitro*. Assim, podemos sugerir a participação de outros mecanismos, além dos hemodinâmicos, para a acentuada vasoconstrição renal na sepse, como por exemplo: a excessiva ativação do sistema renina-angiotensina na sepse (NITESCU *et al.*, 2008), aumento da atividade do SNS (PLEINER, 2002), produção massiva de NO (TIWARI *et al.*, 2005), isquemia e apoptose renal (WANG *et al.*, 2012) e aumento do estresse oxidativo renal (WANG *et al.*, 2012). Nós não avaliamos nenhum mecanismo específico envolvido na IRA renal. Entretanto, a redução da resposta renal e sistêmica para catecolaminas e angiotensina, acompanhadas de elevação dos níveis séricos de NOx e do estresse oxidativo renal, nos fornece evidências que esses mecanismos possam estar envolvidos na IRA de sepse ao menos no modelo e tempo avaliados no presente estudo.

Em contraste com a vasoconstrição renal, a vasodilatação sistêmica é um dos grandes problemas da sepse severa e do choque séptico (DELLINGER *et al.*, 2013). A problemática é traduzida principalmente por uma hipotensão severa, que prejudica a perfusão tecidual de vários órgãos e também da difícil restauração dos valores de PAM. Tradicionalmente, a hiporreatividade para vasoconstritores na sepse representa um desafio tanto para a terapêutica quanto para as pesquisas científicas (DELLINGER *et al.*, 2013; FARAND *et al.*, 2006). Idealizando uma ferramenta farmacológica perfeita para a reversão da hipotensão na sepse e para as alterações encontradas no presente estudo, teríamos um agente vasoconstritor com um bom efeito em restaurar os níveis pressóricos para valores normais e sem efeito, ou melhor, não acentuando ou mesmo diminuindo a vasoconstrição no leito vascular renal, visto que o sistema renal na sepse já apresenta vasoconstrição excessiva. Dentro da rotina clínica do paciente com sepse, os agentes vasopressores são comumente utilizados com o objetivo de restaurar os níveis pressóricos (ALBANÈSE *et al.*, 2004; DELLINGER *et al.*, 2013); no entanto, os efeitos desses agentes em outros órgãos muitas vezes são desconhecidos ou desconsiderados.

Em nosso estudo, dentro dos agentes vasoconstritores utilizados, somente a noradrenalina e a vasopressina foram capazes de restaurar os níveis pressóricos dos animais com sepse 18 h após sua indução. E, ainda, os resultados do presente estudo confirmaram a presença da hiporreatividade sistêmica para agentes vasoconstritores (fenilefrina e angiotensina II) nos animais com sepse (Grupo CLP 18 h). De forma muito interessante, a noradrenalina (nas doses baixa e intermediária adotadas neste estudo) demonstrou boa resposta nos animais com sepse, pois ambas efetivamente restauraram os valores de PAM em animais do grupo CLP 18 h. Por outro lado, a maior dose utilizada não gerou um incremento adicional da PAM; ao contrário, acentuou a redução do FSR e elevou ainda mais a RVR nos animais com sepse. Esse efeito também foi observado nos animais do grupo controle. Esses dados se correlacionam com situações rotineiras no tratamento clínico da sepse, onde são necessárias altas doses de noradrenalina ou a associação de dois ou mais agentes vasoconstritores (DELLINGER *et al.*, 2013), e sugerem que a administração de doses elevadas desses vasoconstritores pode acentuar a baixa perfusão tecidual e vasoconstrição renal.

O incremento das doses de agentes vasoconstritores com o objetivo de reverter a hipotensão na sepse é amplamente utilizado clinicamente e discutida principalmente pela falta de conhecimento acerca dos efeitos desses agentes nos diversos leitos vasculares. Observações com humanos demonstram que a noradrenalina não modifica a função renal (ALBANÈSE *et al.*, 2004; MARIK, 2004). Porém, alguns estudos demonstram que quando a mesma é usada em altas doses pode induzir a vasoconstrição renal. A dose adequada para restaurar a pressão arterial que não prejudica a perfusão sanguínea renal ainda é ponto de debate (MARIK, 2004; FARAND *et al.*, 2006). Os efeitos da noradrenalina no sistema renal são foco de muita discussão em diferentes estudos (BELLOMO & GIANTOMASSO, 2001; ALBANÈSE *et al.*, 2004; MARIK, 2004; FARAND *et al.*, 2006; DELLINGER *et al.*, 2013).

A resposta do leito vascular renal para agentes pressóricos ainda é pouco estudada. Desta forma, o conhecimento do comportamento do tônus renal para agentes vasoativos usados na sepse nos demonstrou ser algo extremamente interessante. Assim, além das alterações funcionais renais, nós avaliamos a reatividade cardiovascular e renal, com o objetivo de comparar o leito vascular renal e a PAM, visto que o leito renal demonstra um efeito particular na sepse. Nossos resultados demonstram a redução da resposta renal para as catecolaminas nos animais com sepse. Com exceção dos efeitos sistêmicos da noradrenalina, foi possível observar a correlação entre a hiporreatividade na PAM e FSR para a fenilefrina e dobutamina, nos animais com sepse.

Na sepse, o uso da dobutamina é recomendado em pacientes com quadro de disfunção cardíaca (DELLINGER *et al.*, 2013). Entretanto, alguns estudos buscam averiguar os efeitos da dobutamina em outros órgãos. Em animais com sepse, por exemplo, a infusão de dobutamina demonstra positivos efeitos na restauração hemodinâmica (LOBO *et al.*, 2009), assim como no fluxo sanguíneo mesentérico (LOBO *et al.*, 2009; BACKER *et al.* 1996), e efeito hepatoprotetor (FINK *et al.*, 2013). Em estudo com ratos endotoxêmicos, a administração de dobutamina restaurou a queda do FSR (LAMBALGEN *et al.* 1994). Nós não evidenciamos esse efeito nos animais com sepse por modelo de CLP. Estes resultados sugerem que esse efeito, talvez seja decorrente da diferença entre os modelos experimentais usados para induzir a sepse, e ainda por nosso modelo (grupo CLP 18 h) não

causou disfunção cardíaca. Além disso, a administração *in bolus* da dobutamina pode ter mascarado alguns efeitos, visto que clinicamente é geralmente administrada por infusão contínua.

De um modo geral, a hiporreatividade para catecolaminas na sepse é um evento bem descrito em diferentes estudos experimentais relacionados à pressão arterial (SORDI *et al.*, 2011; GUARIDO *et al.*, 2014), e em modelo de vasos isolados *in vitro* (O'BRIEN *et al.*, 2005). Por outro lado, existem poucos estudos sobre a reatividade renal na sepse. Um estudo interessante, realizado por Boffa & Arendshorst (2005), demonstrou que a reatividade renal em camundongos após 14 h da administração de LPS é mantida para angiotensina II, noradrenalina e L-NAME. Esses achados não evidenciam os resultados encontrados em nosso estudo, mas, um estudo realizado por Guarido *et al.*, (2014), demonstrou que ratos endotoxêmicos (24 h após a administração de LPS) apresentam redução da resposta para fenilefrina e aumento para vasopressina na PPR em modelo de rim isolado. Esses resultados corroboram os achados no presente estudo dos animais com sepse (CLP 18 h).

Em geral, a diminuição do efeito das catecolaminas tem sido demonstrada em muitas patologias com ativação excessiva do SNS como, por exemplo, na insuficiência cardíaca. Na sepse, muitas evidências demonstram o aumento da atividade do SNS, inclusive no sistema renal (SCHRIER & WANG, 2004). A redução dos efeitos das catecolaminas (noradrenalina, fenilefrina e dobutamina) no leito vascular renal de animais com sepse reflete uma analogia direta entre a ativação excessiva do sistema nervoso simpático (SNS) na sepse e a diminuição da reatividade vascular sistêmica e renal para catecolaminas. O mecanismo clássico de dessensibilização de receptores adrenérgicos tem sido proposto como um possível mecanismo para essa redução dos efeitos das catecolaminas (PLEINER, 2002). Em nosso estudo não realizamos a avaliação da expressão dos receptores adrenérgicos nos rins, mas assim como observado em outros leitos vasculares, a vasoconstrição renal em resposta às catecolaminas também é mediada pelos receptores α -adrenérgicos (SALOMONSSON *et al.*, 2000). Muitos estudos com sepse confirmam a diminuição da expressão dos receptores α -1- adrenérgicos. Além disso, na sepse outros mecanismos moleculares podem estar envolvidos na diminuição dos efeitos das catecolaminas, como a diminuição da adenilato ciclase (SILVERMAN *et al.*,

1993) e dos níveis de proteína G (alfa) (MATSUDA *et al.*, 2000). Nesse sentido, diante da hiporreatividade renal para catecolaminas observada nos animais do grupo CLP 18 h do presente estudo, podemos sugerir que o leito vascular renal demonstra mecanismos comuns a outros leitos vasculares na sepse. Entretanto, mesmo acompanhado de característica hiporreatividade para agentes vasoativos, o leito vascular renal ainda permanece com redução do FSR e elevada vasoconstrição. Neste sentido, estudos referentes à expressão dos receptores adrenérgico assim como os mecanismos moleculares envolvidos na resposta vascular renal para os agentes vasoconstritores na sepse precisam ser ainda investigados.

A produção excessiva de NO é um dos mecanismos bem documentados e descritos em diferentes estudos para a disfunção vascular e redução dos efeitos das catecolaminas na sepse. (PARRATT, 1998; BOSMANN & WARD, 2014). A redução dos efeitos de vasoconstritores na pressão arterial em animais não-sépticos pode ser observada após a infusão de um doador de NO (SILVA-SANTOS & ASSREUY, 1999), semelhante ao observado na disfunção vascular na sepse. Sistemicamente, os efeitos do NO estão bem evidentes e descritos. Entretanto, mesmo frente a essa produção excessiva de NO o sistema renal continua com redução do FSR e com vasoconstrição. Alguns estudos apontam a produção excessiva de NO como responsável pelo aumento da toxicidade tecidual renal pelo aumento do estresse oxidativo (WANG *et al.*, 2012; SEIJA *et al.*, 2012). Nossos dados corroboram com esses estudos pois observamos aumento dos níveis séricos de NOx e do estresse oxidativo renal nos animais do grupo CLP 18 h. No entanto, mais estudos devem ser realizados com o objetivo de avaliar essa via no sistema renal durante a sepse. Alguns estudos experimentais demonstram que a infusão de um agente antioxidante em animais controles causa aumento do FSR e diminui a resposta da fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II no FSR (JUST *et al.*, 2007). Em animais com sepse, a administração do MnTE-2-PyP, um agente mimético da superóxido dismutase, 30 minutos antes da administração do LPS, aumentou o FSR e a taxa de filtração glomerular em ratos endotoxêmicos (WANG *et al.*, 2012). Em nosso estudo, o aumento do estresse oxidativo renal não elevou a resposta vascular renal para vasoconstritores. Ao contrário, nós evidenciamos que a administração de angiotensina II foi associada à hiporreatividade tanto na PAM quanto no FSR em animais do grupo CLP 18 h, mesmo com níveis elevados de estresse oxidativo renal.

Essa redução do efeito nos animais com sepse pode ser pela diminuição da expressão dos receptores AT1 em animais com sepse (BUCHER *et al.*, 2001) ou ainda pelo excesso de angiotensina II no tecido renal (GUPTA *et al.*, 2007). A angiotensina II, o principal peptídeo efetor do SRAA, não é clinicamente utilizada no tratamento da sepse, porém é um potente vasoconstrictor em condições normais, e atualmente tem sido foco de muitos estudos com sepse (BUCHER *et al.*, 2001; NITESCU *et al.*, 2008), pois existem muitas evidências de sua participação na IRA decorrente da sepse (NITESCU *et al.*, 2008; BUCHER *et al.*, 2001). De um modo geral não podemos sugerir que o aumento do estresse oxidativo na sepse seja o responsável pela hiper-reatividade a agentes vasopressores como por exemplo, a angiotensina II.

Muitas alternativas vêm sendo estudadas e discutidas, com o objetivo de reduzir o uso e as doses de catecolaminas exógenas, ou, melhorar a responsividade a esses agentes; um clássico exemplo é a inibição da produção de NO. Entretanto, mesmo diante de estudos experimentais promissores, na clínica a realidade foi bem diferente, demonstrando um aumento da mortalidade dos pacientes com sepse que fizeram uso de um inibidor não seletivo da iNOS (LOPEZ *et al.*, 2004). Nesse sentido, outros mecanismos têm sido investigados na sepse.

Em condições fisiológicas a produção de NO está diretamente relacionada com a ativação de diferentes vias e mecanismos compensatórios como, por exemplo, a ativação de canais de K⁺. Neste contexto, alguns estudos têm mostrado um estado de maior ativação dos canais de potássio na sepse (BUCKLEY *et al.*, 2006; LANGE *et al.*, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2009; SORDI, *et al.*, 2010). Desde então, os bloqueadores de canais de K⁺ vêm sendo avaliados como uma ferramenta farmacológica promissora capaz de minimizar e reverter o quadro hipodinâmico na sepse. No entanto, ainda não são utilizados na clínica para tratamento da sepse, mesmo com estudos experimentais promissores. Os poucos estudos clínicos demonstram resultados até o momento controversos e não muito claros (WARRILOW *et al.*, 2006; MORELLI *et al.*, 2007). Cabe ressaltar, ainda, que os efeitos do uso desses bloqueadores em outros órgãos durante a sepse ainda é pouco conhecido. Desta forma, com o objetivo de conhecer melhor a participação dos canais de potássio e do seu respectivo bloqueio no sistema vascular renal em um modelo experimental com sepse, nós utilizamos os bloqueadores tetraetilamônio

(TEA), glibenclamida (GLB) e iberiotoxina (IBTX), e adicionalmente os abridores de canais de potássio minoxidil e NS1619.

Canais de potássio são proteínas celulares envolvidas no influxo e efluxo do potássio, e têm sido extensamente explorados no rim, pela sua grande participação do controle eletrolítico através das células tubulares no néfron, bem como pelo seu papel crítico na regulação do volume (HEBERT *et al.*, 2005). Existem muitas evidências que diferentes subtipos de canais de K^+ estão expressos nos vasos renais e desempenham importantes funções na regulação da hemodinâmica renal (SORENSEN *et al.*, 2012). Entretanto, até o momento não existem estudos que explorem a participação dos canais de potássio nas mudanças que ocorrem no leito vascular renal durante a sepse experimental.

É muito interessante ressaltar que nós encontramos que em rins isolados de animais com sepse, o TEA, um bloqueador não seletivo de canais de K^+ , foi capaz de normalizar a resposta da fenilefrina na PPR. Esses resultados claramente sugerem que, como previamente demonstrado em outras células musculares lisas vasculares (HALL *et al.*, 1996; SORRENTINO *et al.*, 1999; KUO *et al.*, 2009), ocorre uma ativação anormal dos canais de potássio também no leito vascular renal. Outro resultado interessante a ser considerado é o efeito da noradrenalina na PPR, que não foi afetada pelo TEA. Embora tanto a fenilefrina quanto a noradrenalina sejam capazes de ativar receptores α -adrenérgicos, a noradrenalina também apresenta alta afinidade e capacidade de ativar outros subtipos de receptores α - e β -adrenérgico. Além disso, a ativação dos receptores α -adrenérgicos por diferentes agonistas pode conduzir à estabilização do receptor em conformações diferentes, resultando na modulação de diferentes efetores ou alvos intracelulares (BERG *et al.*, 1998;. KENAKIN, 1995). No entanto, as razões e a relevância da falta de efeito do TEA no aumento da resposta da noradrenalina em rins isolados de animais sépticos ainda precisam ser melhor investigadas.

Como mencionado anteriormente, os canais K_{ir} 6.1 são expressos no leito vascular renal (ZHOU *et al.*, 2007). Estes canais estão envolvidos na vasodilatação das arteríolas aferentes (LORENZ *et al.*, 1992), bem como na regulação do tônus vascular em rins em condições patológicas, tais como a *diabetes* (BRINDEIRO *et al.*, 2012). Nas avaliações *in vitro*, em nosso estudo, a GLB reduziu a PPR basal no grupo CLP 18 h para valores semelhantes aos observados pelos animais controles.

Nossos resultados demonstraram que a GLB não foi capaz de melhorar a reatividade vascular quando testado em avaliações *in vitro* de rins isolados nos animais do grupo CLP 18 h. Por outro lado, a administração da GLB causou redução da resposta para noradrenalina nos animais do grupo CLP 18 h. Esses achados corroboram com estudos em outros leitos vasculares *in vitro* (PREISER *et al.*, 2003). Embora estes dados possam indicar a falta de envolvimento de canais $K_{ir}6.1-6.2$ nas alterações da reatividade vascular em rins de animais com sepse, alguns estudos demonstraram que o PNU-37883A (um inibidor seletivo que interage com a subunidade formadora de poros dos canais $K_{ir}6$), e não a GLB (que inibe a subunidade do receptor sulfoniluréia canais $K_{ir}6$), foi capaz de aumentar a tensão basal em anéis de aorta isolados de ratos com sepse induzida por CLP (KUO *et al.*, 2009). É importante notar que os canais $K_{ir}6.1-6.2$ são formados por duas subunidades principais: os receptores sulfoniluréias (SUR) e as subunidades formadoras de poro (WEI-WEI *et al.*, 2012). O papel da subunidade formadora de poro tem sido investigado na sepse (COLLIN *et al.*, 2011; CHAN *et al.*, 2012). Alguns estudos sugerem que a falta do efeito *in vitro*, seja resultado das doses baixas da GLB, que muitas vezes são incapazes de inibir a subunidade formadora de poro (PREISER *et al.*, 2003; SORRENTINO *et al.*, 1999). Por sua vez, as concentrações de GLB utilizadas *in vitro*, no presente estudo, demonstram efeito similar em comparação com altas concentrações utilizadas em outros estudos *in vitro* (PREISER *et al.*, 2003; SORRENTINO *et al.*, 1999). Assim, essas evidências não nos permite descartar a participação dos canais $K_{ir}6.1-6.2$ nas alterações encontradas *in vitro* na reatividade vascular renal de ratos com sepse.

De um modo geral, o TEA em altas doses é considerado um bloqueador não seletivo de canais de K^+ , mas, em baixas doses, este parece inibir preferencialmente os canais K_{Ca1} (SORENSEN *et al.*, 2012). A concentração de TEA utilizada em nosso estudo *in vitro* pode ser considerada baixa em comparação com outros estudos *in vitro* (SORRENTINO *et al.*, 1999; TERLUK, *et al.*, 2000). Mesmo assim o TEA restabeleceu o efeito da fenilefrina na PPR de preparações obtidas dos animais do grupo CLP 18 h. Logo, esses achados sugerem uma possível participação dos canais $K_{Ca1.1}$ na reatividade do leito vascular renal dos animais com sepse.

Apesar de ser uma ferramenta muito útil para a investigação de mecanismos regulatórios locais e ação de drogas, a aplicabilidade dos resultados obtidos pelo

modelo *in vitro* de rim isolado apresenta limitações importantes, principalmente pela perda da influência do sistema nervoso central, flutuações da pressão arterial, e liberação de hormônios e mediadores inflamatórios que são extremamente importantes na sepse. Em especial, estudos com bloqueadores de canais de potássio, demonstram que existem diferenças entre ensaios *in vitro* e *in vivo* que até então são pouco compreendidas (PREISER *et al.*, 2003; SORRENTINO *et al.*, 1999).

Para contornar as limitações dos estudos *in vitro* e explorar a importância dos resultados obtidos *in vitro*, foi utilizado um sistema de laser Doppler para medir o FSR *in situ*, após administração intravenosa de noradrenalina e fenilefrina, antes e depois do tratamento com os inibidores de canais de K^+ TEA, GLB e IBTx (um inibidor seletivo de canais de $K_{Ca}1.1$, não utilizado nos nossos estudos *in vitro*), bem como os abridores de canais de K^+ minoxidil e NS 1619. Cabe ressaltar que, nestes experimentos, a PAM foi registrada ao mesmo tempo que o FSR. Como esperado, a noradrenalina e a fenilefrina elevaram a pressão sanguínea nos animais do grupo controle, um efeito acompanhado por uma redução significativa no FSR. As análises destes resultados confirmaram que, após a administração de noradrenalina e fenilefrina, a PAM atingiu níveis mais baixos nos animais com sepse do que nos animais do grupo controle, o que está de acordo com a responsividade reduzida para vasoconstritores encontradas no choque séptico. Além disso, os animais com sepse não apresentaram redução de seu FSR após a administração de noradrenalina e fenilefrina, achados que corroboram com a reatividade reduzida para vasoconstritores encontrada no modelo de rim isolado *in vitro*. Os resultados obtidos nestes experimentos também revelaram que a administração de TEA ou GLB em animais com sepse foi capaz de aumentar a PAM basal, assim como a PAM medida durante os efeitos pressóricos induzidos por fenilefrina ou noradrenalina, para os mesmos níveis obtidos nos animais do grupo controle. Foi possível observar a participação dos canais $K_{ir}6.1-6.2$, visto que a administração de minoxidil (um abridor de canais de $K_{ir}6.1-6.2$) resultou em uma redução dos níveis da PAM e das respostas pressóricas para noradrenalina e fenilefrina nos animais com sepse. Por outro lado, assim como observado em outros estudos (SORDI *et al.*, 2010), a administração de IBTx não resultou em elevação dos níveis de PAM nos animais com sepse. Esses achados foram confirmados pelos resultados obtidos com a

administração de NS1619 (um abridor de canais K_{Ca}1.1), que não reduziu os níveis de PAM em nenhum dos grupos (CLP 18 h e controle), tampouco causou modificações nas repostas da PAM para fenilefrina e noradrenalina.

Diversas evidências demonstram que a ativação dos canais K_{ir}6.1-6.2 participa da hipotensão na sepse. De um modo geral, a ativação dos canais K_{ir}6.1-6.2 está relacionada com a produção excessiva de NO, hipóxia, acidose e redução do ATP intracelular (BUCKLEY *et al.*, 2006; LANGE *et al.*, 2007; MORELLI *et al.*, 2007). Nesse sentido, apesar de resultados contraditórios em humanos, a importância dos canais K_{ir}6.1-6.2 não deve ser subestimada, visto que, nesses estudos clínicos vários pontos estão sendo questionados, como a dosagem de GLB utilizada, o número de pacientes, o choque séptico ter sido considerado moderado, e ainda que os pacientes em estudos demonstravam normoxêmicos (BUCKLEY *et al.*, 2006; LANGE *et al.*, 2007; MORELLI *et al.*, 2007). Vale destacar que a ativação dos canais K_{ir} 6 em diferentes estudos está relacionada com condições não fisiológicas. Nesse sentido, Sordi *et al.*, (2011) demonstraram que a administração de GLB 4 h após a indução da sepse por CLP, ao contrário do observado pela administração do TEA, não resultou em elevação da PAM e restauração da reatividade para fenilefrina, e, adicionalmente aumentou a taxa de mortalidade nesses animais. Apesar das divergências entre os efeitos da GLB em estudos experimentais e ensaios clínicos (conforme já mencionado anteriormente), um estudo interessante, realizado por Singler *et al.*, (2005), demonstrou que o uso da GLB em pacientes críticos foi responsável pela elevação da PAM e redução da infusão de noradrenalina. Assim, com base nessas informações, podemos especular uma possível interferência da gravidade da sepse na resposta para a GLB, e considerar esse um ponto relevante tanto nos estudos experimentais como nos ensaios clínicos. No entanto, são achados que ainda permanecem por ser melhor elucidados.

Magnusson *et al.*(2007) mostraram que a administração intrarrenal de TEA, IBTX, ou NS1619, não modificou os efeitos da fenilefrina sobre o FSR em animais do grupo controle. Esses resultados são similares aos encontrados em nosso estudo. Por outro lado, nos animais com sepse, a elevação da PAM basal obtida quando TEA ou GLB foram administrados isoladamente, não foi acompanhada por qualquer alteração no FSR basal. Um ponto muito interessante a ser considerado é

que a administração da GLB ou IBTx foi responsável por acentuar a redução do FSR induzida por fenilefrina e noradrenalina, até então reduzida, nos animais com sepse. Vale destacar que não foram observados efeitos no FSR dos animais com sepse e na resposta para fenilefrina e noradrenalina para os abridores de canais de K^+ , NS1619 e minoxidil.

A noradrenalina assim como a fenilefrina, tanto quanto se sabe, nenhum destes fármacos vasoativos apresenta efeitos deletérios sobre a função renal do paciente séptico, pelo menos, quando utilizadas em dosagens apropriadas e por curtos períodos (ALBANÉSE *et al*, 2004; MORELLI *et al*, 2008). Alguns estudos com humanos saudáveis demonstram que mesmo quando ocorre redução do FSR, a função renal parece ser preservada (HOOGENBERG *et al.*, 1998; RICHER *et al.*, 1996). No entanto, a administração de noradrenalina pode ser utilizada como um modelo experimental de IRA. De grande importância, uma das principais novidades deste estudo é de que a administração de fenilefrina ou noradrenalina após uma infusão *in bolus* de GLB numa dosagem previamente mostrada como o suficiente para bloquear canais $K_{ir}6.1-6.2$ nos vasos (QUAST & COOK, 1989), diminuiu substancialmente o FSR em ratos com sepse. Esta descoberta sugere que o bloqueio farmacológico de canais $K_{ir}6.1-6.2$ pode ser perigoso ao invés de benéfico para a manutenção da função renal na sepse.

A elevação do FSR e a restauração de parâmetros funcionais renais têm sido alvo de muitos estudos na sepse, incluindo a investigação de novos agentes terapêuticos (YASUDA *et al.*, 2006; NITESCU *et al.*, 2008; SEIJA *et al.*, 2012). Diversos autores têm relacionado o aumento do FSR com a diminuição da disfunção renal na sepse. Nesse sentido, ao contrário do que foi observado sistemicamente, melhorar a reatividade no sistema renal para agentes vasoconstritores não parece ser algo interessante na sepse, em especial quando associada com a IRA. Boffa & Arendshorst (2005) demonstraram em camundongos endotoxêmicos que a manutenção da reatividade vascular renal para angiotensina II, noradrenalina e L-NAME, pode contribuir para acentuar a vasoconstrição renal e diminuir a filtração glomerular na sepse. Com base nos nossos resultados, a função vascular renal deve ser cuidadosamente avaliada em estudos com bloqueadores de canais $K_{ir}6.1-6.2$ na sepse, mesmo que no caso de medicamentos inovadores.

É importante ressaltar que nossos resultados não nos permitem afirmar que a redução encontrada no fluxo sanguíneo renal dos animais com sepse após a administração de drogas vasoativas e GLB foram de fato consequência de um aumento da reatividade dos vasos renais. Em primeiro lugar, pelo menos na concentração utilizada, a GLB não aumentou a reatividade para fenilefrina e noradrenalina em rins isolados *in vitro*. Além disso, o TEA, que restaurou a hiporreatividade da fenilefrina na PPR em rins perfundidos *in vitro* de ratos com sepse (grupo CLP 18 h), ao contrário *in vivo* não influenciou o fluxo sanguíneo renal quando associada à fenilefrina ou noradrenalina. Em condições fisiológicas, o fluxo sanguíneo renal sofre pouca influência de alterações na pressão arterial sistêmica. Na sepse severa e choque séptico o sistema vascular, incluindo o renal, não está funcionando em condições fisiológicas, e seria razoável associar a diminuição do FSR medido durante o efeito pressórico induzido por fenilefrina e noradrenalina com o aumento repentino na pressão sanguínea, obtida quando estas drogas vasoativas foram administradas depois de GLB. No entanto, o TEA também aumentou os efeitos pressóricos de ambos (fenilefrina e noradrenalina), mas não teve influência sobre o FSR. Além disso, a IBTx não melhorou a reatividade vascular para fenilefrina e noradrenalina, mas também resultou em uma redução intensa do FSR quando associada com drogas vasoativas. Adicionalmente, o minoxidil, um abridor dos canais $K_{ir}6.1-6.2$, foi responsável por acentuar a hipotensão nos animais do grupo CLP 18 h. Além disso, foi responsável por bloquear a vasoconstrição sistêmica induzida pela fenilefrina e noradrenalina em ambos os grupos controles e CLP 18 h, enquanto o FSR foi preservado. Juntos, esses resultados sugerem uma dissociação entre a exacerbação da redução do FSR e mudanças sistêmicas da PAM induzidos por fenilefrina e noradrenalina após a administração dos bloqueadores de canais de K^+ .

Para investigar se os efeitos desses achados foram restritos aos receptores α -adrenérgicos, nós também avaliamos os efeitos da angiotensina II na PAM e FSR, e encontramos que além da inabilidade da angiotensina II em restaurar a hipotensão associada à sepse, a GLB (mas não a IBTx) também acentuou a redução do FSR induzida por angiotensina II no grupo CLP 18 h. Juntos, esses resultados, com a falta de influencia do minoxidil e do NS 1619 na modulação do FSR dos animais do grupo CLP 18 h mesmo depois da administração da fenilefrina e noradrenalina, ou

angiotensina II, sugerem que a influência da GLB nos efeitos dos vasoconstritores no FSR dos animais com sepse não está associada a um receptor específico, mas sim com possíveis mudanças na estimulação dos efetores e mediadores intracelulares depois da ativação dos receptores de membrana.

Outros mecanismos possivelmente envolvidos nessas alterações seriam de origem hemodinâmica, visto que o rim é um sistema complexo e os efeitos na circulação sistêmica e débito cardíaco refletem diretamente ou indiretamente sobre o FSR. Em nosso estudo não avaliamos o débito cardíaco, entretanto, juntamente com os dados de PAM foram obtidos os valores de FC. Curiosamente, o tratamento com GLB reduziu a FC nos animais do grupo CLP 18 h, principalmente após a administração da fenilefrina e noradrenalina. Adicionalmente, na presença do minoxidil foi observado um aumento do cronotropismo cardíaco em resposta à noradrenalina. Desta forma, podemos sugerir uma participação dos canais K_{ir} 6.1-6.2 no coração dos animais com sepse, visto que muitos estudos ressaltam a importância desses canais em disfunções cardíacas (MIURA & MIKI, 2003; HONG *et al.*, 2014). A IBTx, também resultou em redução da FC após a administração de fenilefrina ou noradrenalina nos animais do grupo CLP 18 h. A bradicardia em resposta ao bloqueio do K_{Ca1} já foi descrita em outros estudos (LAI *et al.*, 2014). Por outro lado, o TEA aumentou o efeito cronotrópico da NE em ambos os grupos. No presente estudo, nós não exploramos qualquer aspecto relacionado com a contratilidade do miocárdio, mas, considerando a importância do débito cardíaco para a manutenção do fluxo sanguíneo renal e as alterações observadas na frequência cardíaca após a administração de bloqueadores dos canais de K^+ seguida da noradrenalina ou da fenilefrina, o papel dos canais de K^+ na função cardíaca durante o choque séptico merece uma investigação mais aprofundada.

Uma das principais características da sepse é o desenvolvimento de hipotensão sistêmica, que atualmente é alvo de reposição de fluídos e administração de vasoconstritores. Se o estado séptico não é controlado pelo conjunto inicial de intervenções clínicas, principalmente por antibióticos, ele pode evoluir rapidamente para o choque séptico, uma condição perigosa caracterizada por hipotensão severa, refratariedade às drogas vasoativas e disfunção de múltiplos órgãos. A hipotensão e a hiporreatividade aos agentes vasoativos está associada com hipoperfusão tecidual e baixo fornecimento de oxigênio a órgãos vitais, incluindo os rins. Uma vez que a

função de canais de K^+ vasculares parece estar prejudicada na sepse, vários estudos têm explorado a capacidade dos bloqueadores de canais de K^+ para reverter a hipotensão e a vasoplegia em modelos experimentais de sepse. Nosso estudo demonstra que, apesar do efeito benéfico da GLB em aumentar a PAM e a reatividade vascular aos vasoconstritores em animais sépticos, o bloqueio de canais $K_{ir}6.1-6.2$ leva a uma redução exacerbada no FSR após a administração intravenosa de fármacos vasoativos, tais como a noradrenalina e a fenilefrina. Este efeito é compartilhado pelo IBTX, um inibidor seletivo de $K_{Ca}1.1$, mas não pelo TEA. Os nossos resultados sugerem que os estudos relativos à modulação farmacológica dos canais de potássio na sepse devem considerar os efeitos finais na perfusão do sangue para os órgãos vitais, como os rins, e não apenas sua capacidade para aumentar a pressão arterial ou a reatividade vascular a vasoconstritores. Enfim, nossos resultados demonstraram que assim como observado em outros leitos vasculares, ocorre a participação desses canais durante a sepse, no sistema renal.

7.CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- a) Os animais no tempo de 18 h após a indução por CLP demonstraram características clássicas da sepse, alterações bioquímicas e funcionais renais que se associam com uma sepse severa com a presença de insuficiência renal aguda;
- b) Dentre os agentes vasoconstritores e inotrópicos utilizados, somente a noradrenalina e vasopressina restauraram os níveis de PAM nos animais com sepse, entretanto sem efeito significativo no FSR;
- c) Assim como observado na PAM, o leito vascular renal demonstra hiporreatividade para fenilefrina e noradrenalina;
- d) A ativação dos canais de potássio participa da hipotensão e hiporreatividade para vasoconstritores observadas nos animais com sepse;
- e) No sistema renal, ao contrário do observado na PAM, o bloqueio dos canais de potássio pode acentuar a redução do FSR em resposta a vasoconstritores;

Juntos esses resultados sugerem uma anormal funcionalidade dos canais de potássio no leito vascular renal durante a sepse, e que o bloqueio de diferentes subtipos de canais de potássio pode prejudicar a perfusão sanguínea dos rins, principalmente quando associados com agentes vasoativos como a noradrenalina e fenilefrina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMBRI, C. *et al.* Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. **Critical Care**, n. 15, v. 6, p. 2-12, 2011.

AIRES, M.M. **Fisiologia**, 2 ed. Guanabara Koogan, 1999.

ALBANÈSE, J; *et al.* LEONE, M; GARNIER, F.; BOURGOIN, A.; ANTONINI, F.; MARTIN, C. Renal effects of norepinephrine in septic and nonseptic patients. **Chest**, v. 126, n. 2, p. 534–9, 2004.

ALBARWANI, S. *et al.* Voltage-gated K⁺ channels in rat small cerebral arteries: molecular identity of the functional channels. **The Journal of Physiology**, v. 551, n. Pt 3, p. 751–63, 2003.

ALMAC, E. *et al.* The acute effects of acetate-balanced colloid and crystalloid resuscitation on renal oxygenation in a rat model of hemorrhagic shock. **Resuscitation**, n. 83, p. 1166– 1172, 2012

ANDERSON, W. P. *et al.* Renovascular Hypertension : Structural Changes in the Renal Vasculature. **Hypertension**, v. 36, n. 4, p. 648-652, 2000.

ASFAR, P. *et al.* Catecholamines and vasopressin during critical illness. **Critical Care Clinics**, v. 22, n. 1, p. 131–49, vii–viii, 2006.

BASILE, D. P.; *et al.* Persistent oxidative stress following renal ischemia-reperfusion injury increases ANG II hemodynamic and fibrotic activity. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 302, n. 11, p. F1494-502, 2012.

BELLOMO, R.; GIANTOMASSO, D. D. Noradrenaline and the kidney: friends or foes? **Critical Care**, v. 5, n. 6, p. 294–8, 2001.

BENES, J. *et al.* Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury : an experimental study. **Critical Care**, v. 15, n. 5, p. R256, 2011.

BERG, K.A., *et al.* Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. **Molecular Pharmacology**, v. 54, p.94-104, 1998.

BIDANI, A. K. *et al.* Renal microvascular dysfunction, hypertension and CKD progression. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2013.

BLANCO, J. *et al.* Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. **Critical Care**, v. 12, n. 6, p. R158, 2008.

BOFFA, J.; ARENDSHORST, W. J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **Journal of the American Society of Nephrology**, 16, p. 117–124, 2005.

BONE, R. C. *et al.* Definitions Guidelines Sepsis for Sepsis and Organ Failure and for the Use of Innovative Therapies in THE. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–55, 1992.

BOSMAN, M. & WARD, P.A. The Inflammatory Response in Sepsis. **Trends Immunology**, n.34, v.3, p. 129–136, 2014

BRINDEIRO, C. M. T. *et al.* Potassium channel contributions to afferent arteriolar tone in normal and diabetic rat kidney. **American Journal of Physiology. Renal Physiology** v. 5850, p. 171–178, 2008.

BRINDEIRO, C.M.T., LANE, P.H., CARMINES, P.K. Tempol prevents altered K(+) channel regulation of afferent arteriolar tone in diabetic rat kidney. **Hypertension**, v. 59, p. 657-664, 2012.

BUCHER, M. *et al.* Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptors During Sepsis. **Hypertension**, v. 38, n. 2, p. 177–182, 2001.

BUCKLEY, J. F.; SINGER, M.; CLAPP, L. H. Role of KATP channels in sepsis. **Cardiovascular Research**, v. 72, n. 2, p. 220–30, 2006.

BURBAN, M. *et al.* Renal macro- and microcirculation autoregulatory capacity during early sepsis and norepinephrine infusion in rats. **Critical Care**, v. 17, n. 4, p. R139, 2013.

CAUWELS, A., BROUCKAERT, P., Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. **Shock**, n. 29, p. 577-582, 2008.

CARMINES, P. K. The renal vascular response to diabetes. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 19, n. 1, p. 85-90, 2010.

CHADE, A. Renal Vascular Structure and Rarefaction. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 2, p. 817–831, 2013.

CHAN, Y. *et al.* Inhibition of vascular adenosine triphosphate-sensitive potassium channels by sympathetic tone during sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 1261-1268, 2012.

CHEN, S.J., WU, C.C., YEN, M.H., Alterations of ex vivo vascular reactivity in intraperitoneal sepsis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, n. 24, p. 786-793, 1994.

CHILTON, L., *et al.* Inward rectifier K(+) currents and Kir2.1 expression in renal afferent and efferent arterioles. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 19, p. 69-76, 2008.

COLLIN, *et al.* Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 37, p. 861-869, 2011.

CZAIKA, G. *et al.* Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia. **Muscle and Nerve** n. 23, p. 967-969, 2000.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney International**, v. 72, n. 5, p. 557–65, 2007.

CHILTON, L. *et al.* Inward rectifier K(+) currents and Kir2.1 expression in renal afferent and efferent arterioles. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 19, n. 1, p. 69–76, 2008.

CHELKO, S. P. *et al.* A novel vascular clip design for the reliable induction of 2-kidney, 1-clip hypertension in the rat. **Journal of Applied Physiology (1985)**, v. 112, n. 3, p. 362-6, 2012.

CLAPP, L. H.; ORIE, N. N. Stoking up BKCa channels in hemorrhagic shock: which channel subunit is really fueling the fire? **Circulation Research**, v. 101, n. 5, p. 436–8, 2007.

COHEN, R. I. *et al.* Renal Effects of Nitric Oxide in Endotoxemia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.164, p. 1890–1895, 2001.

CUPPLES, W. A.; BRAAM, B. Assessment of renal autoregulation. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 5, 2007.

DAUTZENBERG, M.; JUST, A. Temporal characteristics of nitric oxide-, prostaglandin-, and EDHF-mediated components of endothelium-dependent vasodilation in the kidney. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 9, p. R987–98, 2013.

DAUTZENBERG, M.; KEILHOFF, G.; JUST, A. Modulation of the myogenic response in renal blood flow autoregulation by NO depends on endothelial nitric oxide synthase (eNOS), but not neuronal or inducible NOS. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. Pt 19, p. 4731–44, 2011.

D'ELIA, J. A. & WEINRAUCH, L. A. The autonomic nervous system and renal physiology. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 3, n. 6, p. 149–160, 2013.

DELLINGER, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 580–637, 2013a.

DENG, J. *et al.* Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, n. 287, p. C730–C736, 2004.

DEWITTE, A. *et al.* Doppler resistive index to reflect regulation of renal vascular tone during sepsis and acute kidney injury. **Critical Care**, v. 16, n. 5, p. R165, 2012.

DIBONA, G. F. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 5, p. R1517-R1524, 2000.

DOI, K.; *et al.* Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, V. 119, N. 10, P. 2868-78, 2009.

ENYEDI, P.; CZIRJAK, G. Molecular Background of Leak K² Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. **Physiological Reviews**, v. 90, p. 559–605, 2010.

ESPER, A. M.; MARTIN, G. S. Extending international sepsis epidemiology: the impact of organ dysfunction. **Critical Care**, v. 13, n. 1, p. 120, jan. 2009.

FARAND, P.; LAUZIER, F.; PLANTE, G. Neuroanesthesia and Intensive Care Review article: Organ perfusion / permeability- related effects of norepinephrine and vasopressin in sepsis. **Canadian Journal Anesthesia**, v. 53, n. 9, p. 934–946, 2006.

FERRER, R.; LEVY, M. M.; QUINTANA, M. Improvement in Process of Care and Outcome After a Multicenter Severe Sepsis Educational Program in Spain. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 299, n. 19, 2008.

FERNANDES, D. *et al.* Nitric Oxide-Dependent Reduction in Soluble Guanylate Cyclase Functionality Accounts for Early Lipopolysaccharide Induced Changes in Vascular Reactivity. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 983–990, 2006.

FINK, T. *et al.* Dobutamine pretreatment improves survival, liver function, and hepatic microcirculation after polymicrobial sepsis in rat. **Shock**, v. 40, n. 2, p. 129–35, 2013.

FLEMMING, B. *et al.* Oxygen and Renal Hemodynamics in the Conscious Rat. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 18-24, 2000.

FORTIN, C. F. *et al.* Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. **Shock**, v. 33, n. 4, p. 344–52, 2010.

GARDENER, M. J. *et al.* Functional evidence of a role for two-pore domain potassium channels in rat mesenteric and pulmonary arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 192–202, 2004.

GARDINER, S. M. *et al.* Effects of glibenclamide on the regional haemodynamic actions of alpha-trinositol and its influence on responses to vasodilators in conscious rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 3, p. 507–515, 1996.

GIEBISCH, G. Renal potassium channels: function, regulation, and structure. **Kidney International** 60, 436-445, 2001.

GIERTEN, J. *et al.* Regulation of two-pore-domain (K2P) potassium leak channels by the tyrosine kinase inhibitor genistein. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1680–90, 2008.

GROVES, R. *et al.* Plasma catecholamines in patients with serious postoperative infection. **Annals of Surgery**, v.178, p. 102-107, 1973

GU, W.-J. *et al.* The effect of goal-directed therapy on mortality in patients with sepsis - earlier is better: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 570, 20, 2014.

GUAN, Z.; INSCHO, E. W. Endothelin and the Renal Vasculature. **Contributions of Nephrology**, v. 172, p. 35–49, 2011.

GUARIDO, K. L. *et al.* Increased Activation of the Rho-A/Rho-Kinase Pathway in the Renal Vascular System Is Responsible for the Enhanced Reactivity to Exogenous Vasopressin in Endotoxemic Rats. **Critical Care Medicine**, n. 3, p. 1–12, 31, 2014.

GUPTA, A. *et al.* Activated protein C ameliorates LPS-induced acute kidney injury and downregulates renal INOS and angiotensin II. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 0444, p. F245- F254, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed.Elsevier, 2006.

GUZMAN, J. A; ROSADO, A. E.; KRUSE, J. A. Vasopressin vs norepinephrine in endotoxic shock: systemic, renal, and splanchnic hemodynamic and oxygen transport effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 2, p. 803–9, ago. 2003.

HANSEN, P. B. The complex field of interplay between vasoactive agents. **Kidney International**, v.76, 2009

HEEMSKERK, S. *et al.* Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 1, n. 4, p. 853–62, jul. 2006.

HERNANDEZ, • GLENN *et al.* Effects of dobutamine on systemic, regional and microcirculatory perfusion parameters in septic shock: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 8, p. 1435–1443, 2013.

HALL, S., TURCATO, S., CLAPP, L. Abnormal activation of K⁺ channels underlies relaxation to bacterial lipopolysaccharide in rat aorta. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p.184-190, 1996.

HEBERT, S.C., *et al.* Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. **Physiological Reviews**, v.85, p. 319-371, 2005.

HILL, G. S. *et al.* Morphometric evidence for impairment of renal autoregulation in advanced essential hypertension. **Kidney International**, v. 69, n. 5, p. 823–31, mar. 2006.

HOOGENBERG, K.; SMIT, A. J.; GIRBES, A. R. Effects of low-dose dopamine on renal and systemic hemodynamics during incremental norepinephrine infusion in healthy volunteers. **Critical Care Medicine**, v. 26, p. 260–265, 1998.

HONGE, D.; Kir6.2-containing ATP-sensitive K(+) channel is required for cardioprotection of resveratrol in mice. **Cardiovascular Diabetology**, v. 13, n. 35, 2014.

HOUSE, A. A; RONCO, C. Extracorporeal blood purification in sepsis and sepsis-related acute kidney injury. **Blood Purification**, v. 26, n. 1, p. 30–5, 2008.

INCE, C. The microcirculation is the motor of sepsis. **Critical Care**, v. 9 Suppl 4, p. S13–9, 2005.

INTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. www.ilasonlinems.org.br

IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology. www.guidetopharmacology.org

IWASHYNA, T. J.; ANGUS, D. C. Declining Case Fatality Rates for Severe Sepsis: Good Data Bring Good News With Ambiguous Implications. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, p. 2012–2014, 2014.

JI, M.-H. *et al.* Experimental sepsis in pigs--effects of vasopressin on renal, hepatic, and intestinal dysfunction. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 117, n. 3, p. 257–63, 2012.

JUST, A. New investigator award in regulatory and integrative physiology of the water and electrolyte homeostasis section , 2006 : Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 7545, p. R1-R17, 2007.

KARLSEN, F. M. *et al.* Dynamic Autoregulation and Renal Injury in Dahl Rats. **Hypertension**, v. 30, n. 4, p. 975-983, 1997.

KING, E. G. *et al.* Pathophysiologic mechanisms in septic shock. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 94, n. 1, p. 4–12, 2014.

KANE, G.C., *et al.* Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 KATP channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. **FASEB Journal**, v. 20, p. 2271-2280, 2006.

KENAKIN, T., Pharmacological proteus? **Trends in Pharmacological Sciences**, n. 16, p. 256-258, 1995

KOPP, U. C.; JONES, S. Y.; DIBONA, G. F. Afferent renal denervation impairs baroreflex control of efferent renal sympathetic nerve activity. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.295, p. R1882–R1890, 2008.

KUO, J.H., CHEN, S.J., SHIH, C.C., LUE, W.M., WU, C.C. Abnormal activation of potassium channels in aortic smooth muscle of rats with peritonitis-induced septic shock. **Shock**, n. 32, p.74-79, 2009.

LAI, M. H. et al. BK channels regulate sinoatrial node firing rate and cardiac pacing in vivo. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 307, n. 9, p. H1327-38, 2014

LANDRY, D.W. & OLIVER, J.A. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. **Journal of Clinical Investigation**, n. 89, p. 2071–2074, 1992.

LANDSBERG, L.; YOUNG, J. B. The role of the sympathetic nervous system and catecholamines in the regulation of energy metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 1018–24, 1983.

LANGE, M., et al. Short-term effects of glipizide (an adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibitor) on cardiopulmonary hemodynamics and global oxygen transport in healthy and endotoxemic sheep. **Shock**, n. 26, p. 516-521, 2006.

LANGENBERG, C. et al. Renal blood flow in sepsis. **Critical Care**, v. 9, n. 4, p. R363–74, 2005.

LEONE, M. et al. Terlipressin in Catecholamine-Resistant Septic Shock Patients. **Shock**, v. 22, n. 4, p. 314–319, 2004.

LEVY, B. et al. Comparative effects of vasopressin, norepinephrine, and L-canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in endotoxic shock. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 1, p. H209–15, 2004.

LI, A. et al. Hypotension Due to Kir6.1 Gain-of-Function in Vascular Smooth Muscle. **Journal of American Heart Association**, v. 2, p. 1–13, 2013.

LORENZ, J.N., et al. Intracellular Atp Can Regulate Afferent Arteriolar Tone Via Atp-Sensitive K⁺ Channels in the Rabbit. **Journal of Clinical Investigation** 90, 733-740, 1992.

LUGON, J.R., et al. Renal function and glomerular hemodynamics in male endotoxemic rats. **Kidney International**, v. 36, p.570-575, 1989.

LIPCSEY, M.; BELLOMO, R. Septic acute kidney injury: hemodynamic syndrome, inflammatory disorder, or both? **Critical care**, v. 15, n. 6, p. 1008, 2011.

LIU, S. F.; MALIK, A. B. NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, p. L622–L645, 2006.

LOBO, S. M. L. *et al.* Effects of dobutamine on gut mucosal nitric oxide production during endotoxic shock in rabbits. **Medical Science Monitor**. v. 15, n. 2, p. 37–42, 2009.

LÓPEZ, A.; *et al.* Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 1, p. 21–30, 2004.

LOUTZENHISER, R.; *et al.* A. Renal autoregulation : new perspectives regarding the protective and regulatory roles of the underlying mechanisms. **American Journal of Physiology, Regulator, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, p. R1153- 67,: 2006.

LOWRY O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.

LU, Z. *et al.* Two-Pore K⁺ channels, NO and Metabolic Inhibition **Biochem Biophys Res Commun**. n. 9, v. 1, p.194–196,2007.

MAGNUSSON, L. *et al.* Renovascular BK Ca channels are not activated in vivo under resting conditions and during agonist stimulation. **American Journal of Physiology, Regulator, Integrative and Comparative Physiology**, 292: R345–R353, p. 345–353, 2007.

MAIER, S.; *et al.*; PFEFFER, K.; HEIDECKE, C. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 21, n. 6, p. 505-512, 2004.

MARIK, P. E. Renal dose norepinephrine! **Chest**, v. 126, n. 2, p. 335–7, ago. 2004.

MARTIN, G. S. *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546–54, 17 2003.

MARTIN, G. S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 10, n. 6, p. 701–706, 2012.

MATSUDA, N. *et al.* Impairment of Cardiac β -Adrenoceptor Cellular signaling by Decreased Expression of G_{s α} in Septic Rabbits. **Anesthesiology**, v. 6, p. 1465–1473, 2000.

MAY, C. N. *et al.* Novel targets for sepsis-induced kidney injury: the glomerular arterioles and the sympathetic nervous system. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 11, p. 1168–77, 2012.

MAYBAUER, D. M. *et al.* The ATP-sensitive potassium-channel inhibitor glibenclamide improves outcome in an ovine model of hemorrhagic shock. **Shock**, v. 22, n. 4, pp. 387–391, 2004.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4–11, 2014.

MENDES, R. H. *et al.* Moderate hyperhomocysteinemia provokes dysfunction of cardiovascular autonomic system and liver oxidative stress in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 180, p. 43–47, 2014.

MENEZES, G. B. *et al.* Surgical procedures to an experimental polymicrobial sepsis : Cecal Ligation and Puncture. **Braz J Vet Patho** v. 1, n. 2, p. 77–80, 2008.

MILLER, A; COLEMAN, N. Dobutamine and terlipressin in patients with septic shock. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 125; author reply 125–6, jul. 2008.

MIURA, T. & MIKI, T. ATP-Sensitive K⁺ Channel Openers: Old Drugs with New Clinical Benefits for the Heart. **Current Vascular Pharmacology**, v.1 , n. 1, p.251-258, 2003.

MORELLI, A. *et al.* Glibenclamide dose response in patients with septic shock: effects on norepinephrine requirements, cardiopulmonary performance, and global oxygen transport. **Shock**, v. 28, n. 5, p. 530–5, 2007.

MORELLI, A. *et al.* Short-term effects of phenylephrine on systemic and regional hemodynamics in patients with septic shock : a crossover pilot study. **Shock**, v. 29, n. 4, p. 446–451, 2008.

MURUGAN, R. *et al.* Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. **Kidney International**, v. 77, n. 6, p. 527–535, 2010.

NAVAR, G. The Role of the Kidneys in Hypertension. **The Journal Of Clinical Hypertension**. v.7, n.9, 2005.

NAVAR, L. G, *et al.* Concentrations and actions of intraluminal angiotensin II. **ournal of the American Society of of Nephrology**, Suppl 11:S189–S195.1996

NAVAR, L.G.The kidney in blood pressure regulation and development of hypertension. **Med Clin North Am** 81:1165–1198, 1997.

N'GOUEMO, P. BKCa channel dysfunction in neurological diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 373, 2014.

NELSON, M. T. & QUAYLE. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 268, n. 4, p. C799- 822, 1995.

NEMZEK, J. A.; HUGUNIN, M.S.; OPP, M.R. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 2, p. 120- 128, 2008.

NITESCU, N.; GRIMBERG, E.; GURON, G. Low-dose candersatam improve renal blood flow and kidney oxygen tension in rats with endotoxin-induced acute kidney dysfunction. **Shock**, v. 30, n. 2, p. 166–172, 2008.

O'BRIEN, A. et al. Variable effects of inhibiting iNOS and closing the vascular ATP-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock. **Shock**, v. 31, n. 5, p. 535–41, 2009a.

O'BRIEN, A. J. et al. The pore-forming subunit of the K(ATP) channel is an important molecular target for LPS-induced vascular hyporeactivity in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 3, p. 367–75, 2005.

OH, *et al.* Associations between Renal Hyperfiltration and Serum Alkaline Phosphatase. **PloS one**, v.10, n.4, p. 1-11, 2015.

OHKAWA, H. *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem.** v. 95, n.2, p.351-8, 1979.

PADHI, R. *et al.* Hyponatremia in critically ill patients. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 18, n. 2, p. 83–7, 2014.

PAL, G. K. *et al.* Sympathovagal Imbalance Contributes to Prehypertension Status and Cardiovascular Risks Attributed by Insulin Resistance, Inflammation, Dyslipidemia and Oxidative Stress in First Degree Relatives of Type 2 Diabetics. **PloS one**, v. 8, n.11, p.1-7, 2013.

PARRATT, J. R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 41, suppl A, p. 31–39, 1998.

PETRÔNIO, M. S. *et al.* Apocynin: chemical and biophysical properties of a NADPH oxidase inhibitor. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2821–39, 2013.

PICKKERS, P. *et al.* Activation of the Atp-Dependent Potassium Channel Attenuates Norepinephrine-Induced Vasoconstriction in the Human Forearm. **Shock**, v. 22, n. 4, p. 320–325, 2004.

PIECKKERS, P. *et al.* In Vivo Evidence for Nitric Oxide Mediated Calcium-Activated Potassium-Channel Activation During Human Endotoxemia. **Circulation**, v.114, p.414-421, 2006

PIECHOTTA, P. L. et al. The pore structure and gating mechanism of K2P channels. **The EMBO journal**, v. 30, n. 17, p. 3607–19, 2011.

PIHL, L. et al. Insulin induces the correlation between renal blood flow and glomerular filtration rate in diabetes: implications for mechanisms causing

hyperfiltration. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 303, n. 1, p. R39–47, 2012.

PLATAKI, M.; *et al.* Predictors of acute kidney injury in septic shock patients: an observational cohort study. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 6, n. 7, p. 1744–51, 2011.

PLEINER, J. Adrenoceptor Hyporeactivity Is Responsible for Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Vascular Dysfunction in Humans. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 1, p. 95–100, 2002.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F. *et al.* Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30, n. sup 1, p. 53 -59, 2008.

POMPERMAYER, K. *et al.* The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide prevents renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Kidney International**, v. 67, n. 5, p. 1785–96, 2005.

PORTER, T. R. *et al.* Autonomic pathophysiology in heart failure patients. Sympathetic-cholinergic interrelations. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 85, n.5, p. 1362-71, 1990.

PREISER, J. *et al.* Hemodynamic effects of glibenclamide during endotoxemia: contrasting findings *in vitro* versus *in vivo*, **Shock**, v. 19, n. 3, p. 223- 228, 2003

QUAST, U., COOK, N.S., In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 250, p. 261-271, 1989.

QUILLEY, J.; QIU, Y. K(+)-induced vasodilation in the rat kidney is dependent on the endothelium and activation of K⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 508, n. 1-3, p. 193–9, 2005.

REGUEIRA, T. *et al.* Norepinephrine to increase blood pressure in endotoxaemic pigs is associated with improved hepatic mitochondrial respiration. **Critical Care**, v. 12, n. 4, p. R88, 2008.

REGUEIRA, T. *et al.* Physiopathology of acute renal failure during sepsis. **Medicine Intensiva**. v. 35, n. 7, p. 424–432, 2011.

REMICK, D. G.; WARD, P. A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, v. 24, n. sup 1, p. 7-11, 2005.

RICHER, M.; ROBERT, S.; LEBEL, M. Renal hemodynamics during norepinephrine and low-dose dopamine infusions in man. **Critical Care Medicine**, v. 24, p.1150–1156, 1996.

RIEDEMANN, N. C.; GUO, R.; WARD, P. A. The enigma of sepsis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 4, p. 460-467, 2003.

RITTIRSCH, D. *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–6, 2009.

RODRIGUES, C. E. *et al.* Effects of Continuous Erythropoietin Receptor Activator in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury and Multi-Organ Dysfunction. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2012.

RONCO, C. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: ready for routine clinical use? An international perspective. **Blood Purification**, v. 37, n. 4, p. 271–85, 2014.

RUBATTU, S. *et al.* Pathogenesis of Chronic Cardiorenal Syndrome: Is There a Role for Oxidative Stress?. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 23011-23032; 2013.

SALOMONSSON, M.; BRÄNNSTRÖM, K.; ARENDSHORST, W. J. Alpha(1)-Adrenoceptor Subtypes in Rat Renal Resistance Vessels: in Vivo and in Vitro Studies. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 278, n. 1, p. F138–47, 2000.

SHARFUDDIN, A. A.; WEISBORD, S. D.; PALEVSKY, P. M.; MOLITORIS, B. A.; Acute Kidney Injury. In. TAAL, M. W.; CHERTOW, G.; MARSDEN, P. A.; SKORECKI, K.; YU, A. S.L.; BRENNER, B. M.; **Brenner & Rector's: The Kidney**. 9 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012, p 1044-1099.

SCHMIDT, C. *et al.* Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. **Shock**, v. 32, n. 3, p. 239–46, 2009.

Sedlak J & Lindsay RH. Estimation of total, protein- bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25, 192–20, 1968.

SEIJA, M. *et al.* Role of peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. **Shock**, v. 38, n. 4, p. 403–10, 2012.

SILVA, E. *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251–60, 2004.

SILVA-SANTOS, J. E; ASSREUY, J. Long-Lasting Changes of Rat Blood Pressure to Vasoconstrictors and Vasodilators Induced by Nitric Oxide Donor Infusion: Involvement of Potassium Channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 1, p. 380–387, 1999.

SIMON, F. *et al.* Comparison of cardiac, hepatic, and renal effects of arginine vasopressin and noradrenaline during porcine fecal peritonitis: a randomized controlled trial. **Critical Care**, v. 13, n. 4, p. R113, 2009.

SINGER, M. *et al.* Reversal of life-threatening, drug-related potassium-channel syndrome by glibenclamide. **Lancet**, v. 365, p.1873–75, 2005.

SCHRIER, R.W., WANG, W. Mechanisms of disease: Acute renal failure and sepsis. **New England Journal of Medicine**, n. 351, p.159-169, 2004.

SHI, W., *et al.* Lipopolysaccharides up-regulate Kir6.1/SUR2B channel expression and enhance vascular KATP channel activity via NF- κ B-dependent signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 3021-3029, 2010.

SOBEY, C. G. Potassium Channel Function in Vascular Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 28–38, 2001.

SONG, Y. H. *et al.* Predicting factors associated with clinical deterioration of sepsis patients with intermediate levels of serum lactate. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 38, n. 3, p. 249–54, 2012.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 184–9, 2010.

_____; FERNANDES, D.; HECKERT, B. T.; ASSREUY, J. Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1289–301, 2011.

_____; CHIAZZA, T.; PATEL, N. S.; DOYLE, R. A.; COLLINO, M.; THIEMERMANN, C. Preconditioning' with Low Dose Lipopolysaccharide Aggravates the Organ Injury / Dysfunction Caused by Hemorrhagic Shock in Rats. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. 1-15, 2015

SORENSEN, C. M. *et al.* Closure of multiple types of K⁺ channels is necessary to induce changes in renal vascular resistance in vivo in rats. **Pflügers Archiv : European Journal of Physiology**, n. 462, p. 655–667, 2011.

_____; BRAUNSTEIN, T.; SALOMONSSON, M. Role of vascular potassium channels in the regulation of renal hemodynamics. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, n. 302, p. F505-F518, 2012.

SORRENTINO, R.; *et al.* Involvement of ATP-sensitive potassium channels in a model of a delayed vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rats, **British journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1447- 1457, 1999.

SOUZA, A. C. C. P. *et al.* Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and upregulating endothelial nitric oxide synthase Erythropoietin prevents sepsis-related acute kidney injury in rats by inhibiting NF- κ B and upregulating endotheli. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 302, p.F1045-F1054, 2012.

STOCKAND, J. D. Vasopressin regulation of renal sodium excretion. **Kidney International**, v.78, p.849–856, 2010.

SU, F. et al. Effects of a selective iNOS inhibitor versus norepinephrine in the treatment of septic shock. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 243–9, 2010.

TAAL, M. W.; CHERTOW, G.; MARSDEN, P. A.; SKORECKI, K.; YU, A. S.L.; BRENNER, B. M.; **Brenner & Rector's: The Kidney**. 9 ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.

TELES, J. M. M. et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30 Suppl 1, p. 47–52, 2008.

TERLUK, M. R.; SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, n. 361, p. 477–483, 2000.

TEXTOR, S.C. & LERMAN, L. L. Renovascular Hypertension and Ischemic nephropathy. **American Journal of Hypertension** . v.. 23, n.11, p.1159–1169, 2010.

TIWARI, M. M. *et al.* Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 289, p. 1324–1332, 2005.

URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKAMP, A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 16 Suppl 1, n. May, p. S22–30, 2011.

VAN LAMBALGEN, A.A., BOURIQUET, N., CASELLAS, D., 1996. Effects of endotoxin on tone and pressure-responsiveness of preglomerular juxtamedullary vessels. **Pflugers Archiv : European Journal of Physiology** 432, 574-577.

VANELLI, G.; HUSSAIN, S.N.A.; AGUGGINI, G. Glibenclamide, a blocker of ATP-sensitive potassium channels, reverses endotoxin-induced hypotension in pig. **Experimental Physiology**, v.80, p.167–170, 1995.

VILAS-BOAS,F.; FOLLAT, F. Current Insights into the Modern Treatment of Decompensated Heart Failure. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 3, 2006.

WANG, W. *et al.* Interaction among nitric oxide , reactive oxygen species , and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure Interaction among nitric oxide , reactive oxygen species , and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, n. 284, p.F532-F537, 2003.

WANG, Z. *et al.* Development of Oxidative Stress in the Peritubular Capillary Microenvironment Mediates Sepsis-Induced Renal Microcirculatory Failure and Acute Kidney Injury. **The American Journal of Pathology**, v. 180, n. 2, p. 505–516, 2012.

WARRILLOW, S., EGI, M., BELLOMO, R., Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, p. 980-985, 2006.

WEI-WEI, S.; YANG, Y.; YUN, S.; JIANG, C. Invited Review K ATP channel action in vascular tone regulation : from genetics to diseases. **Acta Physiologica Sinica**, v. 64, n. 09, p. 1–13, 2012.

WILLIAMS, S.; BATEMAN, A.; O'KELLY, I. Altered expression of two-pore domain potassium (K2P) channels in cancer. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e74589, 2013.

YASUDA, H. *et al.* Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. **Kidney International**, v. 69, n. 9, 1535–1542, 2006.

YILMAZ, M. B. *et al.* Renal effects of levosimendan: a consensus report. **Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy**, v. 27, n. 6, p. 581–90, dez. 2013.

ZAGER, R. A. *et al.* Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 290, p.F1453-F1462, 2006.

ZHOU, J. *et al.* Epidemiology and outcome of severe sepsis and septic shock in intensive care units in mainland China. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e107181, 2014.